

Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität pflanzlicher
Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin an den
Beispielen von *Astragalus membranaceus*, *Coptis spec.*,
Forsythia suspensa und *Leonurus japonicus*



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Brem
aus Karlsruhe
2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Jörg Heilmann

Promotionsgesuch eingreicht am: 27.11.2009

Prüfung abgelegt am: 18.12.2009

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. A. Buschauer (Vorsitzender)
Prof. Dr. J. Heilmann (Erstgutachter)
Prof. Dr. G. Franz (Zweitgutachter)
Prof. Dr. J. Schlossmann

Für meine Frau

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Zielsetzung	9
3	Resultate.....	11
3.1	Astragali radix	11
3.1.1	Prüfung auf Identität.....	11
3.1.1.1	Makroskopische Prüfung.....	11
3.1.1.2	Mikroskopische Prüfung.....	13
3.1.1.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	14
3.1.2	Bestimmung des Trocknungsverlustes.....	23
3.1.3	Bestimmung der Asche	23
3.2	Coptidis rhizoma	24
3.2.1	Eigenschaften	24
3.2.2	Prüfung auf Identität.....	24
3.2.2.1	Makroskopische Prüfung.....	24
3.2.2.2	Mikroskopische Prüfung	25
3.2.2.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen I	27
3.2.2.4	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen II	36
3.2.3	Bestimmung des Trocknungsverlustes.....	36
3.2.4	Bestimmung der Asche	37
3.2.5	Gehaltsbestimmung von Isochinolinalkaloiden	38
3.2.5.1	Gehaltsbestimmung mittels HPTLC.....	38
3.2.5.2	Gehaltsbestimmung mittels HPLC.....	58
3.3	Epiberberin	74
3.3.1	Isolierung	74
3.3.2	Strukturüberprüfung	77
3.4	Forsythiae fructus.....	78
3.4.1	Eigenschaften	78
3.4.2	Prüfung auf Identität.....	78
3.4.2.1	Makroskopische Prüfung.....	78
3.4.2.2	Mikroskopische Prüfung	79
3.4.2.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	80
3.4.3	Bestimmung des Trocknungsverlustes.....	96
3.4.4	Bestimmung der Asche	96
3.4.5	Gehaltsbestimmung von Forsythosid A.....	97
3.4.5.1	Gehaltsbestimmung mittels HPTLC.....	97

3.4.5.2	Gehaltsbestimmung mittels HPLC.....	110
3.5	Leonuri herba	120
3.5.1	Prüfung auf Identität.....	120
3.5.1.1	Makroskopische Prüfung.....	120
3.5.1.2	Mikroskopische Prüfung	121
3.5.1.3	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	122
3.5.2	Bestimmung des Trocknungsverlustes.....	131
3.5.3	Bestimmung der Asche	131
3.5.4	Gehaltsbestimmung Gesamtflavonoide.....	132
4	Diskussion.....	133
4.1	Astragali radix	133
4.2	Coptidis rhizoma	134
4.3	Forsythiae fructus.....	136
4.4	Leonuri japonici herba.....	137
5	Zusammenfassung-Monographievorschläge.....	139
5.1	Goldfadenwurzelstock	139
5.2	Forsythiafrüchte.....	142
5.3	Chinesisches Mutterkraut	145
6	Experimenteller Teil	148
6.1	Drogen	148
6.2	Geräte	148
6.3	Lösungsmittel	149
6.4	Referenzsubstanzen	149
6.5	Materialien	150
6.6	Methoden.....	150
6.6.1	Bestimmung der Asche	150
6.6.2	Bestimmung des Trocknungsverlusts.....	151
6.6.3	Bestimmung des Geruchs	151
6.6.4	Methodik für die HPTLC	151
6.6.5	Validierungsprotokoll für die HPTLC-Drogenidentifizierung	154
6.6.6	Validierungsprotokoll für HPTLC	160
6.6.7	Validierungsprotokoll für die HPLC.....	177
6.6.8	HPLC-Methoden	187
6.6.9	HPTLC Methoden	188
6.6.9.1	Methode für die Identifizierung von Astragali radix	188
6.6.9.2	Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von Coptidis rhizoma.....	189
6.6.9.3	Methode für die Identifizierung von Forsythiae fructus	189

6.6.9.4	Methode für die Quantifizierung von Forsythsid A in Forsythiae fructus	190
6.6.9.5	Methode für die Identifizierung von Leonuri herba.....	191
7	Literaturverzeichnis	192
8	Abbildungsverzeichnis	196
9	Abkürzungsverzeichnis	200
10	Danksagung	202

1 Einleitung

Die Vielfalt und Akzeptanz der alternativen Heilmethoden hat in den letzten Jahren in Deutschland zugenommen. Zu etablierten alternativen Heilmethoden wie der Homöopathie sind beispielsweise Ayurvedische Medizin, Afrikanische Medizin und Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) mit Akupunktur und Moxibustion hinzugekommen bzw. erfreuen sich immer größerer Beliebtheit.

Die Gründe für die Zunahme der alternativen Heilverfahren sind vielfältig. So werden aus der Traditionellen Ayurvedischen Medizin Teilaspekte in dem aktuellen Trend der so genannten „Wellness“ verwendet.

Das Gesundheitssystem, das einerseits in Kassenpatienten und Privatpatienten unterscheidet und andererseits mit der stark technikorientierten Medizin wenig auf den Patienten als Menschen eingeht und nur versucht die Funktionalität des Körpers wieder herzustellen, führt zu einer zunehmenden Unzufriedenheit der Patienten. Diese sehen sich dann bei einer „alternativen Medizin besser aufgehoben. Zu dem ist der philosophische, ganzheitliche Ansatz der TCM ein Grund für den wachsenden Zuspruch.

Oft besteht auch eine diffuse Angst vor chemisch-synthetischen Wirkstoffen, die aus Sicht medizinischer Laien mehr schaden als nützen. Gestützt durch die Hinweise in den Packungsbeilagen zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen vor allem in Verbindung mit mangelnder Aufklärung durch Ärzte und Apotheker, machen die scheinbar nebenwirkungs-freie Phytotherapie attraktiv.

Auch der beeindruckende Fundus an Pflanzen, die in der TCM verwendet werden, ist Anlass zur Hoffnung auf neue Wirkstoffe und wirksame Extrakte und weckt somit das Interesse der Forschung an der TCM. Dass dies nicht unbegründet ist, zeigen Beispiele von bekannten Pflanzen wie *Ginkgo biloba*, die in der modernen Phytotherapie in Form von Extrakten mit großem klinischem Nutzen eingesetzt werden. Auch wiederentdeckte Pflanzen wie *Artemisia annua*, deren Inhaltsstoff Artemisinin neue Therapieoptionen für die Behandlung der Malaria tropica ermöglicht hat, sind hier zu nennen.

Theoretisch/philosophischer Hintergrund der TCM

Die TCM bedient sich des Bildes von Yin und Yang, welches für gegensätzliche Prinzipien steht. Yang verbindet sich ursprünglich mit der Vorstellung des Besonnenen und daher Warmen und Hellen, mit Yin ist der Gedanke an Schattiges und daher Kühles und Dunkles verbunden. Der Übergang zwischen Yin und Yang ist fließend. Diese Grunddeutung erlaubt es weitere Gegensatzpaare zu bilden (Sonne/Mond). Mit der durchgängigen Anwendung

dieser binären Einteilung auf die Gesamtheit aller Dinge und Vorstellungen wurde der Gegensatz von Yin und Yang in den Rang einer universalen Gegebenheit erhoben, welche die gesamte Wirklichkeit konstituiert und charakterisiert.

Ein zweites Bild ist die Fünf-Wandlungsphasen-Lehre, die die Qi-Dynamik in einen Kreislauf einbindet. Jede Phase geht aus einer vorherigen hervor und dann in die nächste über. Es entstehen auch Gegensätze und Paare etwa nach dem Muster des Verhältnisses zwischen Großmutter und Enkel. Den Phasen sind fünf Elemente zugeordnet: Holz, Feuer, Erde, Metall und Wasser. Der menschliche Organismus schließlich wird als ein Zusammenwirken von fünf „Organen“ begriffen, von denen jedes seinen besonderen Bezug zu einer der fünf Phasen hat. Untereinander sind sie im Modus des Auseinanderentstehens aneinander gebunden. Es sind die Leber, das Herz, die Milz, die Lunge und die Niere.

Probleme bei der Anwendung von Drogen aus der TCM

Die Anzahl der in der Traditionellen Chinesischen Medizin verwendeten Substanzen ist zahlreich. In der ersten Ausgabe der „Chinese Materia Medica“ aus dem Jahr 1596 sind 1892 Substanzen für den medizinischen Gebrauch genannt, davon 1173 pflanzlicher Herkunft. In der „Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine Substances“ aus dem Jahr 1977 sind über 5000 Einträge zu finden. Die aktuelle Pharmakopöe der Volksrepublik China (Ph. VR China) enthält ca. 500 Monographien, Angaben von BENSKY (2004).

Im Rahmen der traditionellen Anwendung sind in Ph. VR China auch stark toxische Drogen im Einsatz. Ein prominentes Beispiel ist *Aconiti radix lateralis praeparata* und *Aconiti radix praeparata* mit neurotoxischen Inhaltsstoffen, die schon bei geringen Dosen für den Menschen tödlich sein können. Der wirksame Inhaltsstoff ist das Alkaloid Aconitin, mit einer Dosis letalis von 5 mg. Diese Toxizität steht diametral zu dem Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG), das in § 5 (1) festlegt: „Es ist verboten, bedenkliche Arzneimittel in den Verkehr zu bringen“ und weiter in (2), das selbst bei „bestimmungsgemäßigem Gebrauch schädliche Wirkungen“ über ein vertretbares Maß hinausgehen [AMG (2009a)]. Zwar sind im Europäischen Arzneibuch Drogen monographiert die toxische Sekundärstoffe beinhalten, wie z.B. *Belladonnae folium* und *Digitalis folium*. Diese Drogen sind aber nicht für den direkten Gebrauch als wässriger Teeaufguss gedacht und eine OTC-Abgabe verbietet sich gemäß AMG. Diese Drogen sind für Isolierung der starkwirksamen Inhaltsstoffe monographiert. Die Einzelsubstanzen werden dann in Arzneiformen verarbeitet und sind dann per Definition keine Phytopharmaka mehr. Somit ist klar, dass toxische Drogen für die Verwendung als „Pflanzliche Drogen zur Teebereitung“ [Ph. Eur. (2008a)] nicht Zugang in das Arzneibuch finden können.

Das Problem der Toxizität ist auch in der TCM bekannt, jedoch ist die Sichtweise eine andere. Toxizität kann eine Voraussetzung für Wirksamkeit sein, begründet durch die potentielle Gefahr, die von einer Pflanze ausgeht. „Alle Drogen, auch die westlichen Medikamente, sind aus der Sicht der TCM Gifte.“ [KÖRFERS (2009a)]. Für *Aconiti radix* sieht die Monographie bei „Usage and dosage: Usually used after processed“. Es ist eine Verwendung ausschließlich nur nach vorbehandeln (processing) der Droge vorgesehen. Eine starke Wirksamkeit ist in diesem Fall bekannt und wird durch traditionelle Verfahren abgeschwächt. Eine akute Toxizität ist folglich gemildert.

Viele Drogen werden nach bestimmten Verfahren der Pao-Zhi-Technik behandelt. Ebenso gehören Anbau, Ernte, Reinigung, Trocknen und Lagern zur Pao-Zhi-Technik. Speziell sind damit Röst-Verfahren, Rösten unter Zusatz von gereinigtem Sand, Muschelkalk oder Talkum, Brennen, Verarbeitung mit Wasser, Verarbeitung mit Reiswein, Verarbeitung mit Essig, Verarbeitung mit Salzlösung, Verarbeitung mit Ingwer, Verarbeitung mit Honig sowie Entölen und Zermahlen zu verstehen. Ein Überblick ist bei KÖRFERS (2009b) zu finden. Durch die spezielle Aufbereitung kann auch die Resorption bestimmter Inhaltsstoffe der Drogen verändert werden, ihre Funktion abgeändert, ihre Wirkung modifiziert oder ihre Toxizität verringert werden. Damit soll die Effektivität der Behandlung erhöht und mögliche Nebenwirkungen für den Patienten reduziert werden. Für die Anwendung der Drogen sind diese Verfahren wichtig, ohne diese Vorbehandlung gelten sie oft nur als Gewürze. Dieses Verständnis pflanzlicher Drogen deckt sich nicht mit dem europäischen. So ist in der Ph. Eur. Monographie „Pflanzliche Drogen“ eine Definition gegeben: „Pflanzliche Drogen bestehen im allgemeinen aus noch unverarbeiteten ganzen, zerkleinerten Pflanzen, Pflanzenteilen, Algen, Pilzen oder Flechten; sie werden gewöhnlich in getrocknetem, manchmal auch in frischem Zustand verwendet. Als Drogen werden weiterhin auch bestimmte pflanzliche Ausscheidungen betrachtet, sofern sie noch nicht verarbeitet sind [Ph. Eur. (2008b)].

Eine weitere Gefahr ist die Verwechslung von in Pinyin geschriebenen Drogenbezeichnungen. In von VANHERWEGHEM (1993) erstmals dokumentierten Fällen ist in Belgien Guang Fanji (*Aristolochia fanchi*, Fam.: *Aristolochiaceae*) mit Han Fangji (*Stephania tetrandia*, Fam.: *Menispermaceae*) aufgrund eines Übersetzungsfehlers verwechselt worden. Folge der Verwechslung war akutes Nierenversagen und dialysepflichtige Patienten. Die für die Intoxikationen verantwortlichen Inhaltsstoffe sind Aristolochiasäuren. Später wurde von STIBOROVÁ (2008) gezeigt, dass die endemische Balkan-Nephropathie der Donauregion eben die Folge einer chronischen Vergiftung mit Aristolochiasäuren war. Diese Fälle zeigen auf, dass bei der Anwendung von TCM-Drogen äußerste Sorgfalt und auch Sachkenntnis notwendig ist, um schwerwiegende Behandlungsfehler auszuschließen. Die Problematik der

Verwechslungsgefahr hat auch Niederschlag im DAC gefunden. Hier ist seit 2002 eine Monographie zu Thema „Pflanzliche Drogen zur Anwendung in der Traditionellen Chinesischen Medizin“ vorhanden. Es soll einer Verwechslung der Drogen *Akebiae caulis*, *Asari heterotropoides radix*, *Asari sieboldii radix*, *Aucklandiae radix*, *Clematis armandii caulis*, *Clematis montanae caulis*, *Cocculi radix*, *Simomenii caulis* und *Stephania tetrandrae radix* vorgebeugt und ein DC-Nachweis der Aristolochiasäuren durchgeführt werden.

Die mangelnde Qualität der auf dem Markt befindlichen Drogen ist immer wieder Grund für Beanstandungen, eine Tatsache die schon seit längerer Zeit bekannt ist. Das Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker (ZL) [IHRIG (2004)] hat die Qualität von TCM-Drogen untersucht. Es wurden Überschreitungen bei Pflanzenschutzmitteln, Schwermetallen, Mikroorganismen und Aflatoxinen festgestellt. Eine Belastung der Drogen mit Schwermetallen und Pestiziden ist im Sinne einer akuten Toxizität für Patienten weniger gefährlich, eine chronische Vergiftung mit Schwermetallen oder Pestiziden ist aber ebenso wenig zu tolerieren. Entsprechende Grenzwerte sind in den Monographien: „2.8.13 Pestizid Rückstände“, „5.1.4 Mikrobiologische Qualität“ im Ph. Eur. festgelegt, die Grenzwerte für Aflatoxine für Arzneimittel sind in der „Aflatoxin Verbotsverordnung“ festgelegt und sind dann im Rahmen einer pharmazeutischen Qualitätskontrolle zu kontrollieren, wenn die Droge im Sinne des AMG § 2 als Arzneimittel gilt mit der Zweckbestimmung, z.B. eine Krankheit zu heilen. Für Schwermetalle gibt es einzelne Grenzwertangaben in Drogenmonographien und eine Arzneimittel-Kontaminanten-Empfehlung des Bundesministeriums für Gesundheit für Schwermetalle, die aber nicht verabschiedet wurde [BMG (1991)]. Die Grenzwerte wurden [KABELITZ (1998)] aber als zu niedrig angesehen.

Eine besondere Situation ist der Handel im Internet mit schon gebrauchsfertigen „TCM-Drogen“ in Form von Dragees und Kapseln mit Bezeichnungen wie z.B. ‘Darling Tian Ran Jian Fei’ die an TCM-Drogen erinnern sollen. Es werden hier Produkte mit einer guten Wirksamkeit bei Übergewicht, Potenzproblemen, Haarausfall, Gelenkschmerzen ausgelobt. Für die Wirkung werden von den Anbietern Inhaltsstoffe von mehr oder weniger bekannten Pflanzen aus der TCM verantwortlich gemacht, die, da es sich, so die Aussage der Anbieter, um rein pflanzliche und damit „natürliche“ Mittel handelt, keine negativen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben. Bei eingehender Analyse der Präparate stellt sich heraus, dass oft eine nicht deklarierte Beimengung von stark wirkenden Substanzen für die Wirkung verantwortlich ist. Die Auswahl an verwendeten Substanzen ist so vielfältig wie die angepriesenen Wirkungen, Sibutramin und Ephedrin in Schlankheitsmitteln, Yohimbin und Sildenafil in Potenzmitteln, Corticoide in Mitteln gegen Schmerzen. Verbraucherschützer warnen deswegen vor kritiklosem Bezug und Anwendung solcher Mittel aus dem Internet.

Für die Kontrolle dieser falsch deklarierten Ware aus dem Ausland ist der Zoll zuständig, der entsprechende Gesetze umsetzen muß.

Die stetig steigende Akzeptanz der TCM in westlichen Ländern lässt auch die Nachfrage an diesen Drogen steigen. Die Belastung der Wildbestände durch verstärkte Sammlungen kann enorm werden. Ein sehr drastisches Beispiel ist die Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC), deren Bestände in Südafrika und Namibia stark zurückgegangen sind. Darüber hinaus wird durch das Ausgraben der Wurzel die umliegende Vegetation ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen. Wenn die entsprechende Pflanze kultivierbar ist, kann diese Zerstörung der natürlichen Habitate durch Anbau auf Kulturlächen reduziert werden. Aber auch Kulturlächen sind nicht immer unproblematisch für die Umwelt. Als Stichworte sind hier der Verbrauch von großen Mengen Trinkwasser und die Bodenversalzung durch Mineraldüngung zu nennen. Aber auch das Bewässern der Anbauflächen mit Wasser aus durch Industrieabwässern belasteten Flüssen kann zum Eintrag von Schwermetallen führen. Da Wildsammlungen in der Regel von ungelernten Arbeitern durchgeführt werden, sind Verwechslungen nicht zu vermeiden. Diese müssen nach der Sammlung von Experten erkannt und eliminiert werden.

Ein möglicher Weg zur Entspannung der Situation ist die Kultur von TCM Drogen in Deutschland oder Gesamt-Europa. Arbeiten des Instituts für Heil- und Gewürzpflanzen an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft zeigen gute Ergebnisse [BOMME (2004)], die auf einen kontrollierten Anbau in Deutschland hoffen lassen. Die Folge ist eine Veränderung der angebotenen Qualität. Der Habitus aus Kultur gewonnener Drogen ist oft unterschiedlich zu Wildsammlungen, die Pflanzen können unter kontrollierten Bedingungen schneller Biomasse zulegen, da der Konkurrenzdruck entfällt, Wasser und Nährsalze werden oft von außen zugeführt. Die unter natürlichen Bedingungen gewachsenen Pflanzen sind oft gedrungener und das Inhaltsstoffspektrum kann unterschiedlich zu Wildvorkommen sein.

Bedingt durch die vielfältigen Probleme, die bei Beschaffung und dem Einsatz von TCM-Drogen auftauchen, ist ein „Gemeinsames Statement der Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker und der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft“ herausgegeben worden in dem gefordert wird, TCM-Drogen als Arzneimittel einzustufen und nicht als Lebensmittel (Nahrungsergänzungsmittel), um die TCM-Drogen verpflichtend nach den Vorgaben des AMG zu prüfen und so die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten.

Rechtliche Grundlagen

Das Arzneibuch ist in § 55 des Arzneimittelgesetzes begründet. Es besteht aus dem Deutschen, Europäischen und Homöopathischen Arzneibuch und ist "eine vom Bundesministerium bekannt gemachte Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln

über die Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln und den bei ihrer Herstellung verwendeten Stoffen“. Über die Regeln des Arzneibuchs entscheiden die zuständigen Arzneibuch-Kommissionen, jedoch kann das Bundesministerium für Gesundheit aus fachlichen oder rechtlichen Gründen die Bekanntmachung ablehnen oder rückgängig machen. Die zuständigen Arzneibuch-Kommissionen sind die Deutsche und die Homöopathische Arzneibuch-Kommission mit Sitz beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Bonn, sowie die Europäische Arzneibuch-Kommission, die ihren Sitz beim Europarat in Straßburg hat [AMG (2009b)].

Das AMG definiert Qualität folgendermaßen: „Qualität ist die Beschaffenheit eines Arzneimittels, die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird“ [AMG (2009c)]. Somit ist die Qualität im pharmazeutischen Sinn klar definiert.

Die Methoden des Arzneibuchs gelten als validiert, sie sind für den Zweck der Analyse geeignet und führen zu reproduzierbaren Ergebnissen. Die für die Qualitätsprüfung zu verwendenden Methoden sind prinzipiell vorgegeben durch die „Allgemeinen Methoden“ des Arzneibuchs. Für die Erstellung von Arzneibuchmonographien ergibt sich aus § 55 AMG die grundsätzliche Forderung nach einem dokumentierten Beweis, dass eine Methode die vorher spezifizierten Anforderungen erfüllt (Validität). Dies ist in gängigen GMP-Regelwerken, wie beispielsweise dem EU-GMP-Leitfaden und der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) in § 14 eine grundsätzliche Forderung für die Erstellung von allen Untersuchungsmethoden. Umfang von Validierungen sind in Europa, Japan und den USA durch die „Internationale Conference On Harmonisation“ (ICH) und der Guideline Q2 (R1) vereinheitlicht.

Besonderer rechtlicher Status pflanzlicher Arzneimittel in Europa

Für pflanzliche Arzneimittel gelten, wie für Arzneimittel mit chemisch eindeutig definierten Substanzen ebenso, die gleichen Bestimmungen des Arzneimittelrechts. Es ist somit nachzuweisen, dass pharmazeutische Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des pflanzlichen Arzneimittels gegeben sind.

Die Prüfung der Qualität erfolgt mit Untersuchungen zur Identität, Reinheit und Gehalt. Die Beschaffenheit der verwendeten pflanzlichen Drogen muss besonderen Standards genügen, die in den entsprechenden Einzelmonographien und den „Allgemeinen Vorschriften“ des Arzneibuchs angegeben sind. Den Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels kann in einem Zulassungsverfahren auf Basis pharmakologisch-toxischer und klinischer Studien erbracht werden.

Zusätzlich ist, wenn es sich um ein „allgemein medizinisch verwendetes“ Arzneimittel handelt, eine Zulassung anhand bibliografischer Daten möglich. Auf behördlicher Ebene erarbeitet der Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel (Committee for Herbal Medicinal Products, HMPC) der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) Monographien. In Deutschland hatte die Kommission E am damaligen Bundesgesundheitsamt (BGA) so genannte Aufbereitungsmonographien zur Anwendung von über dreihundert Drogen und Drogenzubereitungen verfasst, die den Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis widerspiegelt. Hinzu kommen die Materialsammlungen von Verbänden wie der Kooperation Phytopharmaka und auf europäischer Ebene die Euro-Monographien der European Scientific Cooperative on Phytotherapy [ESCOP (2003)].

Neben der Zulassung ist in den EU-Mitgliedstaaten für bestimmte Phytopharmaka ein vereinfachtes Verfahren in Form der „Registrierungsunterlagen für traditionelle pflanzliche Arzneimittel“ (AMG § 39b) möglich, wobei der Nachweis der Wirksamkeit auf dokumentierter traditioneller Erfahrung beruht. Dazu muss für das pflanzliche Arzneimittel eine mindestens 30-jährige Erfahrung, davon mindestens 15 Jahre in einem EU-Mitgliedstaat, belegt werden. Die traditionellen Anwendungsmöglichkeiten werden als Liste durch den Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel der EMA zusammengestellt und veröffentlicht. Die Registrierung als traditionelles Arzneimittel berücksichtigt, dass es in einigen Staaten eine Vielzahl an pflanzlichen Präparaten gibt, die eine lange Tradition haben und eine hohe Sicherheit aufweisen, deren Wirksamkeit sich aber nur schwer mittels klinischer oder bibliografischer Nachweise belegen lässt.

Monographieaufbau Deutsches (Europäisches) Arzneibuch versus Chinesisches Arzneibuch

Der Aufbau der Monographien der englischen Ausgabe der Ph. VR. China 2005 besitzt eine ähnliche Gliederung wie im Deutschen Arzneibuch (DAB) und Ph. Eur. Der Monographietitel ist in Latein und Englisch angegeben, zusätzlich ist noch in Form von Schriftzeichen und in Pinyin, der phonetischen Umschrift der Schriftzeichen in das lateinische Alphabet. Es folgt die Definition der Droge mit dem wissenschaftliche Namen, dem Organ der Stammpflanze und dem Erntezeitpunkt. Oftmals werden im DAB Eigenschaften der Droge, wie Geruch oder Geschmack der Droge aufgeführt, dieser Punkt ist in den Monographien der Ph. VR China nicht genannt. Die Prüfung der Identität wird im DAB in der Regel mit den drei Prüfungen A, B und C durchgeführt. A ist die makroskopische Prüfung der meist getrockneten „Ganz“-Droge, diese Prüfung erfolgt im Ph. VR China unter dem Punkt „Description“ (Beschreibung). Prüfung B ist eine mikroskopische Prüfung der gepulverten Droge, in der Ph. VR China erfolgt diese unter dem Punkt „Identification“ (Identität) oft in Kombination mit einer

„transverse section“ (Querschnittsuntersuchung) die im DAB nicht mehr durchgeführt wird. Die Untersuchungen zu Identität C mittels Dünnschichtchromatographie (DC/HPTLC) erfolgt ebenfalls unter dem Punkt „Identification“. Die Gehaltsbestimmungen von Drogen erfolgen unter Angaben, die denen des DAB's ähneln, es sind aber durchaus auch semiquantitative DC-Untersuchungen üblich. Einen Punkt Reinheit (Test) gibt es in der Ph. VR China nicht. Vorgaben wie Trocknungsverlust, Asche usw. werden einzeln abgefragt. Traditionell erfolgt ein „Processing“ (Bearbeitung/Veredelung) der Droge, was auch in den Monographien seinen Niederschlag findet (siehe oben). Die Beschreibung einer Bearbeitung der monographierten Drogen ist im DAB nicht vorgesehen, da sich hieraus nur schwer abzuschätzende Veränderungen in der Droge ergeben und sich die Qualität, in diesem Fall Zusammensetzung und Gehalt der Inhaltsstoffe, der Droge nicht vorhersehbar verändert. Deshalb sieht die Ph. Eur. ein spezielles Kapitel „Processing“ vor. Angaben zur Wirkungsweise werden unter den Punkten „Action“ und „Indications“ in den chinesischen Monographien angeführt. Dies bezieht sich auf den theoretischen philosophischen Überbau in der TCM der in der „modernen“ westlichen Medizin in dieser Form nicht hergestellt werden kann. „Usage and dosage“ (Verwendung und Dosierung) werden im DAB nicht angegeben.

Bedingt durch die ständige Arbeit an den Monographien sind Aufbau und Formulierungen nicht immer identisch und Abweichungen in Nuancen vorhanden. Für die Erstellung von Monographien ist es notwendig, den vom Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte [BfArM (2005a)] erwünschten Aufbau und die technischen Anforderungen nach den „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ [EDQM (2005a)] zu erarbeiten. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass sich dieses Handbuch hauptsächlich auf chemisch definierte Substanzen bezieht. Auf der Homepage des EDQM ist eine neuere Version einsehbar, zusätzlich ist ein „Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal preparations“ [EDCM (2007a)] vorhanden.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Monographievorschläge von Drogen aus dem Bereich der Traditionellen Chinesischen Medizin für das Deutsche Arzneibuch zu erarbeiten.

Wie in der Einleitung beschrieben bedingt die Nachfrage aus westlichen Ländern eine gleich bleibend gute Qualität der Drogen für die Anwendung als Arzneimittel. Die gesetzlichen Vorgaben schaffen dabei den Rahmen für eine Prüfung der Qualität im pharmazeutischen Sinne. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die ausgewählten Drogen Spezifikationen erarbeitet, die nach aktuellem wissenschaftlichen Stand eine ausreichend gute Qualität der Drogen und die Arzneimittelsicherheit gewährleisten sollen.

Ausgangspunkt für die Erstellung der Monographien war die Pharmakopöe der Volksrepublik China 2005, engl. Edit. [Ph. VR. China (2005a)]. Zusätzlich wurden, falls vorhanden, die entsprechenden Monographien des Japanischen Arzneibuchs, der Hong Kong Materia Medica Standards Volume 1 und 2 sowie die Monographien von WAGNER (1997), (2004), (2005), für einen Vergleich herangezogen.

Die Monographievorschläge wurden nach dem „Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal preparations“ der EDQM erstellt. In den Titel der Monographien erscheint zusätzlich die Drogenbezeichnung in chinesischen Schriftzeichen und in Pinyin. Grundlage waren die Monographien aus Ph. VR. China, die Vorgaben des genannten Guides sind ansonsten für die Monographievorschläge bindend.

Die Definition der Drogen wurde aus den Monographien der Ph. VR. China übernommen, sofern sich keine neueren Erkenntnisse bezüglich der wissenschaftlichen Artbezeichnung ergeben haben. Für die makroskopische und mikroskopische Identifizierung des Drogenmaterials werden die Angaben der Ph. VR. China eigenen Untersuchungen gegenübergestellt und überprüft.

Die Prüfung der Identität erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und hochauflösender Dünnschichtchromatographie (HPTLC). Die Methoden der Ph. VR. China wurden überprüft und gegebenenfalls an die Anforderungen des Ph. Eur. angepasst. Wenn eine Anpassung nicht möglich war, waren neue Methoden zu entwickeln, die eine schnelle und effiziente Identifizierung der Drogen ermöglichen sollen. Die „NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES“ [CPMP/ICH/381/95] sieht für die Validierung von Identitätsprüfungsmethoden nur eine Prüfung der Spezifität vor. Abweichend davon wurde es für die vorliegenden Untersuchungen zur Identitätsprüfung als wichtig angesehen, dass eine Untersuchung der Präzision, Spezifität und die Robustheit der Methode erfolgte. Im Rahmen der Robustheit sollte idealerweise eine Übertragung der chromatographischen Bedingungen von HPTLC auf DC möglich sein.

Für die Gehaltsbestimmungen wurden die Methoden der Ph. VR China (falls vorhanden) überprüft und gegeben falls an die Anforderungen des DAB angepasst. Bei der Auswahl der zu quantifizierenden Inhaltsstoffe wurden in erster Linie die in der Ph. VR China erfassten Inhaltsstoffe übernommen. Bei quantitativen dünnenschichtchromatographischen Methoden aus dem Ph. VR China wurde zusätzlich eine HPLC-Methode mit entwickelt, für beide Methoden die Parameter bestimmt und verglichen. Wesentliches Ziel war es für die Monographien schnelle, einfach durchzuführende, wenig störanfällige und robuste Methoden der Quantifizierung zur Verfügung zu stellen.

3 Resultate

3.1 Astragali radix

„Die getrockneten Wurzeln von *Astragalus membranaceus* BFE. var. *mongholicus* (BGE.) HSIAO oder *Astragalus membranaceus* (FISCH.) BGE. aus der Familie der Fabaceae. Diese werden im Frühjahr oder im Herbst geerntet, die feinen Nebenwurzeln und der Wurzelkopf werden entfernt und getrocknet [Ph. VR China(2009b)].

3.1.1 Prüfung auf Identität

3.1.1.1 Makroskopische Prüfung

Die von verschiedenen Anbietern auf dem deutschsprachigen Markt erhältlichen Drogen sind vom Erscheinungsbild homogen. Der Schnitt der Wurzeln erfolgte entweder senkrecht oder diagonal im flachen Winkel zur Wachstumsachse (Abb. 1-6). Es ergaben sich Wurzelabschnitte von 0,3 bis 2,5 cm Durchmesser, einer Dicke von 0,5 bis 1 cm und im Fall der Droge der Firma Complemedis, bedingt durch den diagonalen Schnitt, eine Länge von ca. 4 cm.

Das Drogenmaterial der „Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft“ (LfL) ist nicht kommerziell erhältlich und wurde uns von Herrn Prof. Dr. Ulrich Bomme (Freising / Weihenstephan) überlassen. Hier lagen Wurzelabschnitte mit einem Durchmesser von 0,2 bis 2 cm und einer Länge von 1 bis 10 cm vor. Die Bruchstückenden waren stark ausgefranst und eingerissen.

Prof. Dr. Gerhard Franz konnte eine Probe von einem lokalen Markt aus Hongkong erwerben. Es fanden sich hier Wurzelabschnitte mit einer Breite von ca. 2 cm, einer Dicke von 0,5 cm und bedingt durch den zu diagonalen Schnitt im spitzen Winkel zur Wachstumsachse Stücke mit einer Länge von ca. 8 cm.

Die Oberflächen waren bräunlich, unregelmäßig mit Furchen und Unebenheiten die parallel zur Wachstumsachse verlaufen. Die Wurzelrinde war hell, weiß bis gelblich, das Holz dunkler, hellgelb und von der Rinde durch einen dunkleren Kambiumstreifen abgegrenzt.

Die untersuchten Proben unterschieden sich makroskopisch. Das heterogene Erscheinungsbild spiegelt die angebotenen Drogen wider, die sich in bedingt durch Alter, Schnittgröße und Herkunft unterscheiden. Dies ist auch von UPTON (2005) beschrieben worden. Für die Untersuchungen ist dies unproblematisch.



Abb. 1: ArP 1

Drogenschnitt erfolgte senkrecht zur Wachstumsachse in 0,5 bis 1 cm dicke Stücke; Durchmesser der Wurzelstücke 0,5 bis 1,5 cm



Abb. 2: ArP 2

Drogenschnitt erfolgte senkrecht zur Wachstumsachse in 0,5 bis 1 cm dicke Stücke; Durchmesser der Wurzelstücke 0,3 bis 2,5 cm



Abb. 3: ArP 3

Droge gebrochen, Länge variierte zwischen 1 und 10 cm; Durchmesser der Wurzelstücke 0,2 bis 2 cm; stark ausgefranste und eingerissene Bruchstückenden



Abb. 4: ArP 4

Drogenschnitt erfolgte diagonal zur Wachstumsachse in 0,5 bis 1 cm dicke Stücke; Durchmesser der Wurzelstücke 1 bis 1,5 cm; Länge ca. 4 cm



Abb. 5: ArP 5

Drogenschnitt erfolgte senkrecht zur Wachstumsachse in 0,5 bis 1 cm dicke Stücke; Durchmesser der Wurzelstücke 0,5 bis 1,5 cm



Abb. 6: ArP 6

Drogenschnitt erfolgte diagonal zur Wachstumsachse in ca. 0,5 dicke Stücke; Durchmesser der Wurzelstücke ca. 2 cm, Länge ca. 8 cm

3.1.1.2 Mikroskopische Prüfung

Die Droge wurde mit einer Tiszmühle zerkleinert und mit einem Sieb der Siebgröße 355 gesiebt. Das Pulver war gelblich bis braun. Es wurde mit Chlorahydrat-Reagenz aufgehellt und mikroskopiert. Einzelne Fasern mit einem Durchmesser von 10 μm und Faserbündel waren gut erkennbar (Abb. 7). Die Fasern sind dickwandig, teilweise haftet parenchymatisches Gewebe an. Im parenchymatischem Gewebe konnten Gefäße mit einem Durchmesser von 30-50 μm erkannt werden (Abb. 8). Frei oder im Gewebe waren Stärkekörner erkennbar (Abb. 9), die einzeln oder in kleineren Verbänden vorliegen. In der Literatur sind ähnliche Angaben zu finden [UPTON (1999)], [Ph. VR China (2005b)]

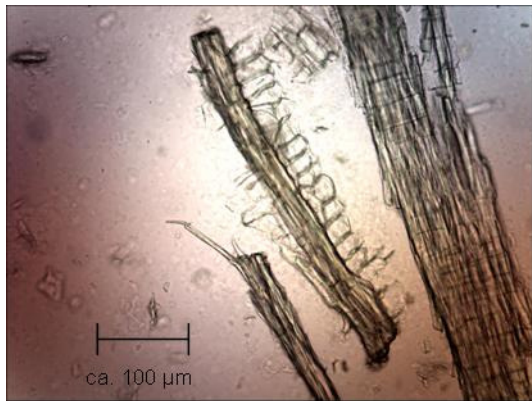


Abb. 7: Faserbündel

Faserbündel mit anhaftendem parenchymatischem Gewebe; einzelne Faser ca. 10 μm breit; Aufhellung mit Chloralhydrat-Reagenz; Vergrößerung 10x10

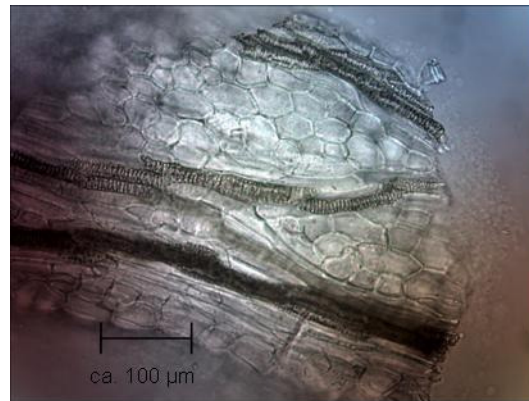


Abb. 8: Gefäße im Parenchym

Gefäßfragmente in parenchymatisches Gewebe eingebettet; Gefäße ca. 30 bis 50 μm breit; Aufhellung mit Chloralhydrat-Reagenz; Vergrößerung 10x10

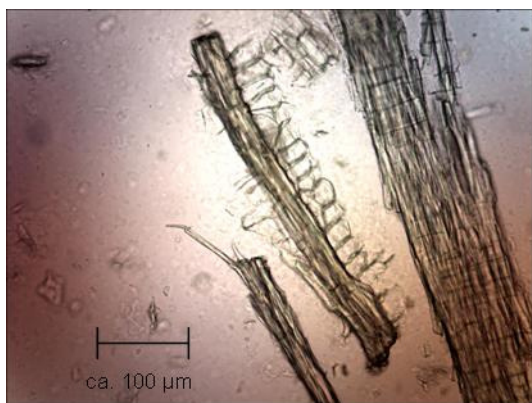
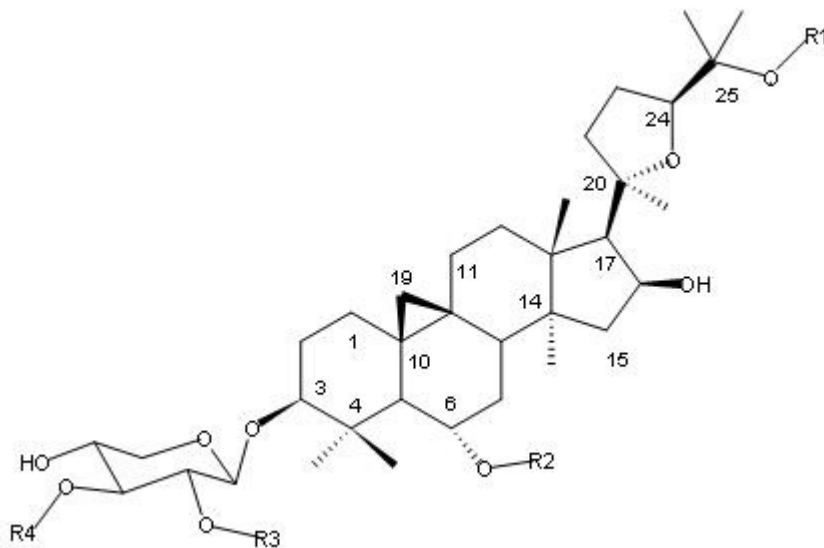


Abb. 9: Faserbündel mit Stärke

Stärkekörner an Faserfragmenten; Färbung mit Iod / Kaliumiodid-Reagenz; Vergrößerung 10x10

3.1.1.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Für die DC/HPTLC-Identitätsprüfung sind verschiedene Methoden entwickelt worden. Die Drogenaufarbeitung spielt dabei eine entscheidende Rolle für die Qualität des Fingerprintchromatogramms. Augenmerk sollte auch auf die Zeit für die Durchführung der Drogenaufarbeitung gelegt werden. So führt die Methode der Ph.VR China zu einer Anreicherung von Astragalosid IV, benötigt aber für die Durchführung der Extraktion ca. 24 h. Daher wurde eine Methode entwickelt, bei der die Drogenaufarbeitung deutlich weniger Zeit beansprucht: 2 g gepulverte Probe wurde mit 60 ml einer Mischung von Methanol/Ethylacetat (1:3) versetzt, 30 min unter Rückfluss extrahiert und filtriert. Das Filtrat wurde zur Trockenen eingedampft, der Rückstand mit 5 ml Ethylacetat aufgenommen und durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wird mit den Referenzsubstanzen Astragalosid I, Astragalosid II, Astragalosid IV, Astragalosid VI, Astragalosid VII und Daidzin auf Kieselgelplatten mit Ethylacetat/Methanol/Wasser (100:20:10) über eine Strecke von 60 mm entwickelt. Die Dokumentation erfolgt nach Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz bei 366 nm.



	R1	R2	R3	R4
Astragalosid I	H	Glc	Ac	Ac
Astragalosid II	H	Glc	Ac	H
Astragalosid IV	H	Glc	H	H
Astragalosid VI	H	Glc	Glc	H
Astragalosid VII	Glc	Glc	H	H

Abb. 10: verwendete Astragaloside

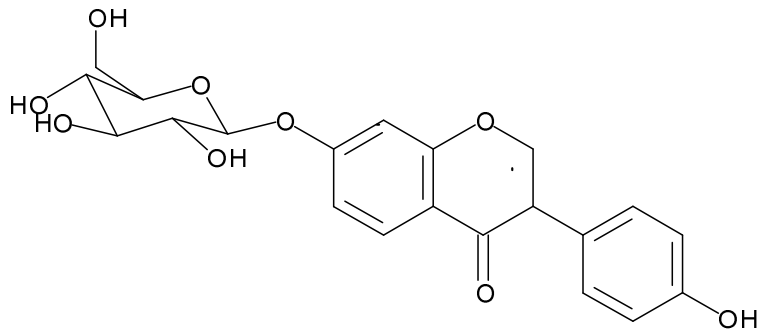


Abb. 11: Daidzin

3.1.1.4 Chromatographische Analytenstabilität

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde der Extrakt punktförmig am Plattenrand einer DC Platte aufgetragen, entwickelt und getrocknet. Die Platte wurde um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Die Analyten der Untersuchungslösung lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden, und es zeigten sich keine Abbauprodukte die abseits der Winkelhalbierenden zu erkennen wären (Abb. 12). Die Stabilität der Analyten während der Chromatographie war somit belegt, da Analyten, die durch chemische Prozesse bei der ersten Entwicklung verändert werden veränderte chemische Eigenschaften zeigen. Diese bewirken bei der zweiten Entwicklung einen abweichenden R_F -Wert und werden als Bande neben der Winkelhalbierenden sichtbar.



Abb. 12: 2-D Entwicklung

5 μ l Astragalus Untersuchungslösung wurden punktförmig aufgetragen und 2-mal entwickelt. Nach der 1. Entwicklung wurde die Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-Mal entwickelt. Danach Derivatisierung mit Schwefelsäure Reagenz und Detektion bei 366 nm

3.1.1.4.1 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für die Prüfung wurden zwei Untersuchungslösungen (Extrakt) im Abstand von zwei Stunden hergestellt (Abb. 13). Ein Aliquot der ersten Lösung wurde sofort auf die Platte aufgetragen, die verbleibende Lösung verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt und

nach zwei Stunden wieder aufgetragen. Die Lösung des zweiten Extraktes wurde sofort zweimal auf die Platte aufgetragen.

Nach Entwicklung, Derivatisierung und Dokumentation der Platte ergaben sich nach visueller Auswertung der einzelnen Bahnen auf der Platte keine Unterschiede der Fingerprints der verschiedenen Extrakte.

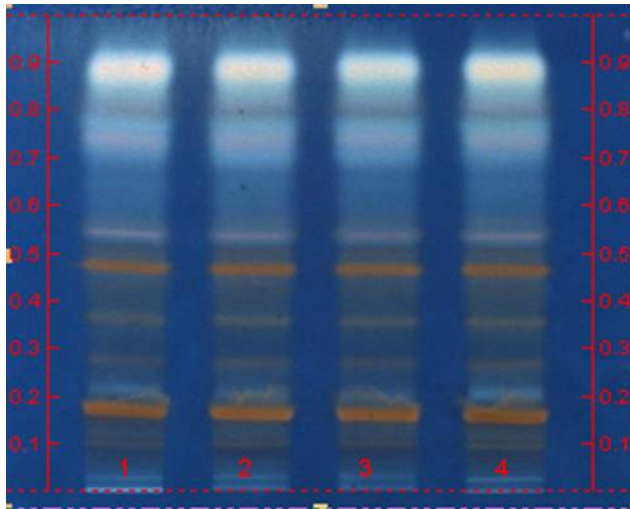


Abb. 13: Stabilität Platte/Lösung

Bahn 1: Astragalus Extrakt 2 h auf der Platte
Bahn 2: Astragalus Extrakt frisch aufgetragen
Bahn 3: Astragalus Extrakt frisch aufgetragen
Bahn 4: Astragalus Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen
Auftragevolumen jeweils 12 µl/ Bande;
Fließmittel Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

3.1.1.4.2 Stabilität der Derivatisierungsergebnisse

Zur Beurteilung der Stabilität der Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz nach Entwickeln der Platte wurde jeweils nach 5 min (Abb. 14), nach 30 min (Abb. 15) und nach 60 min ein Bild bei 366 nm aufgenommen. Die Stabilität wurde akzeptiert, wenn eine Auswertung nach 30 min möglich war und keine starken Veränderungen der Farben und der Farbintensität erkannt werden konnten.

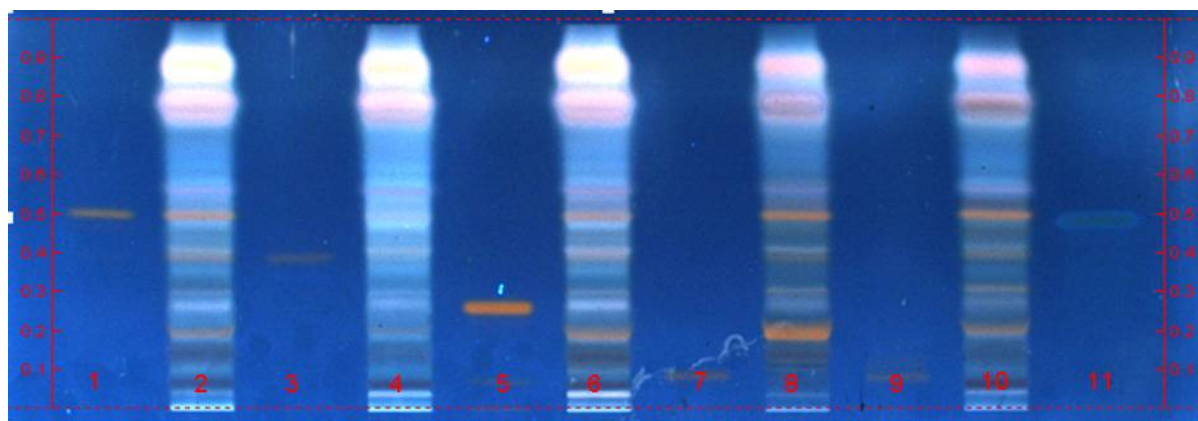


Abb. 14: Stabilität T_5

Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftrage Volumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragevolumen jeweils 12 μ l; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm; Aufnahme 5 min nach der Derivatisierung

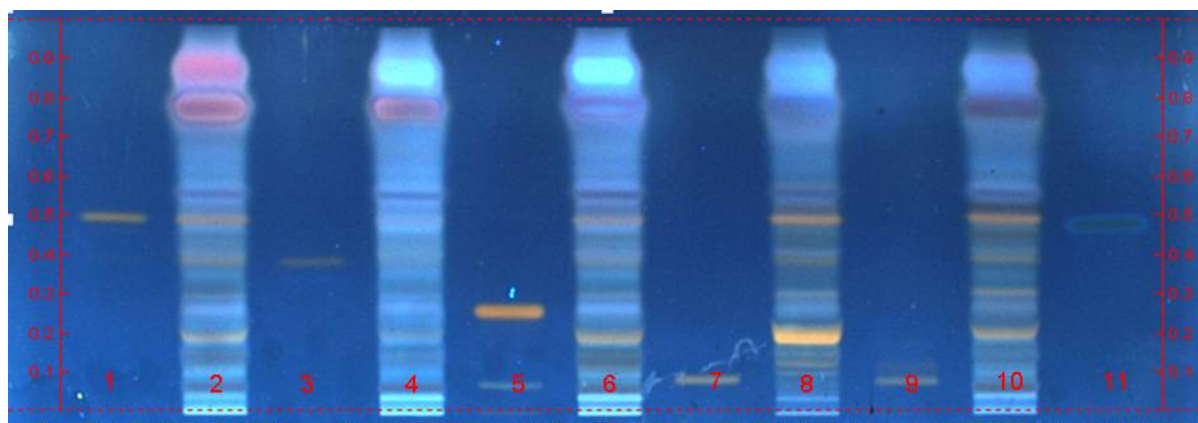


Abb. 15: Stabilität T_{30}

Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftrage Volumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragevolumen jeweils 12 μ l; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm; Aufnahme 30 min nach der Derivatisierung

Die Abb. 14 und 15 zeigen, dass die Stabilität der Derivatisierung akzeptiert werden konnte.

3.1.1.4.3 Spezifität

Für die Untersuchungen konnte authentisches Drogenmaterial von *Astragalus mongholicus* von der LfL erhalten werden. Die Untersuchungslösungen der Drogen von verschiedenen Anbietern (inklusive des auth. Drogenmaterial) wurden wie beschrieben (3.1.1.3) extrahiert und entwickelt. Die Untersuchungen wurden mit frisch hergestellten Extrakten und Referenzsubstanzen durchgeführt. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte nach Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz bei UV 366 nm. Die orangen Banden (mit roten Pfeilen markierte Banden) mussten deutlich getrennt sein. Die Chromatogramme der Untersuchungslösungen zeigten eine sehr ähnliche Abfolge von Banden im Vergleich zur

authentischen Drogenprobe (Bahn 8) unterscheiden sich aber bezüglich der Farbintensität der Banden. Dies kann als semiquantitatives Merkmal zu den Gehalten der Astragaloside in den verschiedenen Proben der Wurzel gedeutet werden.

Bei der Auswertung der Chromatogramme im UV-Licht bei 366 nm erschienen die verschiedenen Astragaloside als orange Banden, Astragalosid I und Astragalosid II sind durch die auf Bahn 1 und Bahn 3 aufgetragenen Referenzsubstanzen in den Drogenextrakten eindeutig zu identifizieren.

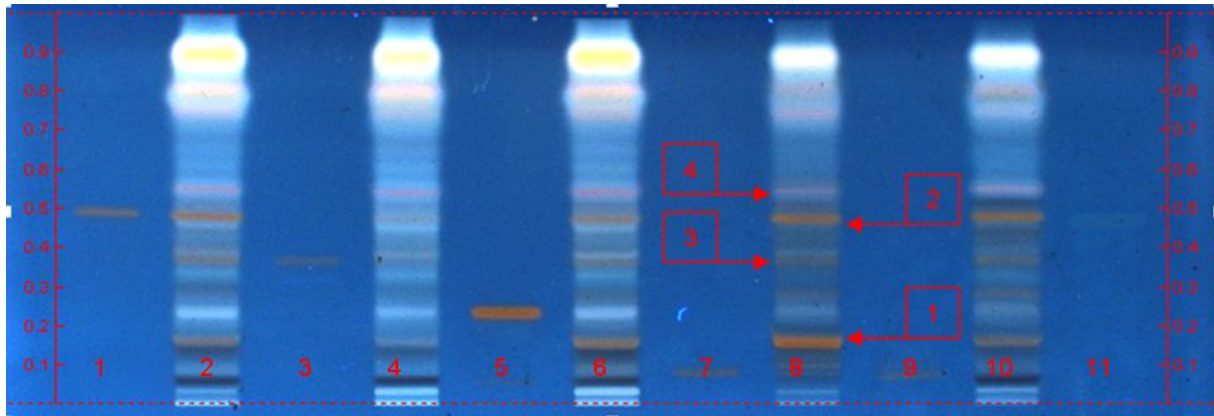


Abb. 16: Spezifität

Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 µl Auftragsvolumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragsvolumen jeweils 12 µl; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.1.1.4.4 Detektion von Verunreinigungen

Die Methode ist für *Astragalus mongholicus* als spezifisch anzusehen, wenn das Fingerprint-Chromatogramm der Verfälschung (*Hedysarum spec.* sind als Verunreinigungen bekannt) bezüglich der Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Banden signifikant unterschiedlich ist zu dem Fingerprint-Chromatogramm der authentischen Droge von *Astragalus mongholicus*.

Der Test konnte wegen fehlender Referenzproben der Verfälschungen nicht durchgeführt werden. Aus abgebildeten Literaturstellen [UPTON (1999)] kann aber bei Auftreten der Astragalosid-Banden in der oberen Hälfte des Chromatogramms das Vorliegen einer reinen *Hedysarum spec.* ausgeschlossen werden, da *Hedysarum spec.* keine Astragaloside enthält. Die Spezifität der Methode befriedigt nicht, muss aber zunächst so akzeptiert werden.

3.1.1.4.5 Wiederholpräzision

Für die Untersuchung der Wiederholpräzision wurden an einem Arbeitstag (ca. 9 h) drei Chromatogramme mit den Lösungen der Referenzsubstanzen und Extrakten unabhängig von einander entwickelt (Abb. 17). Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu hergestellt und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit Schwefelsäure-reagenz derivatisiert, erhitzt und die Dokumentation bei 366 nm durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe identisch waren und auf der Platte parallel sowie ohne Kurven oder Wellen verliefen. Die R_F -Werte der Banden der Astragaloside I, II und IV dürfen auf den drei Platten um nicht mehr als 0,03 R_F -Einheiten von einander abweichen (Tabelle 1).

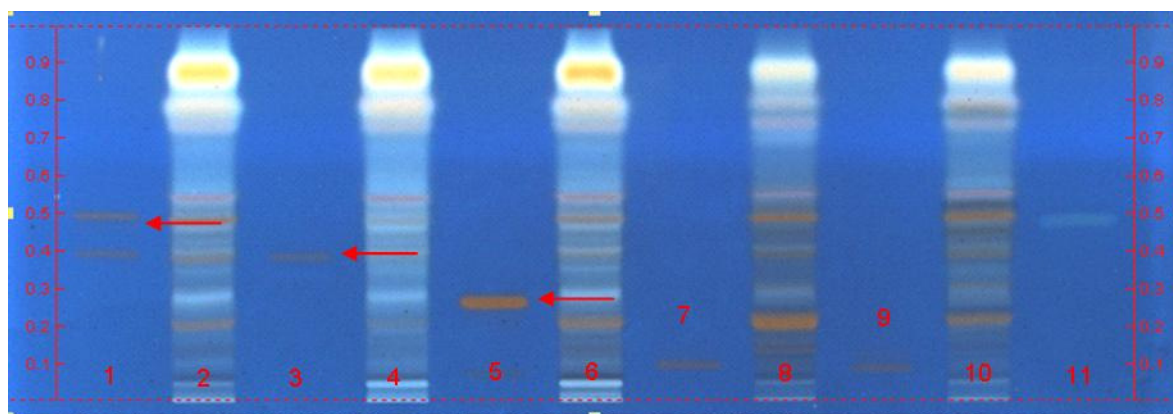


Abb. 17: HPTLC Wiederholpräzision

Rote Pfeile von links nach rechts: Astragalosid I, Astragalosid II und Astragalosid IV, Platte 081022_01_03
Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftrags Volumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5
Auftragsvolumen jeweils 12 μ l; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

Tabelle 1: HPTLC-Wiederholpräzision

Für die repräsentativen Banden von Astragalosid I, II und IV ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,03 R_F -Einheiten

Bande	Plattenbezeichnung			ΔR_F
	Platte 081022_01_01	Platte 081022_01_02	Platte 081022_01_03	
	R_F			
Astragalosid I	0,50	0,49	0,51	0,02
Astragalosid II	0,39	0,37	0,39	0,02
Astragalosid IV	0,26	0,23	0,26	0,03

Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Wiederholpräzision akzeptiert werden.

3.1.1.4.6 Laborpräzision

Zur Überprüfung der Laborpräzision wurde an drei aufeinander folgenden Tagen ein Chromatogramm entwickelt. Die Untersuchungslösungen der Extrakte wurden für jedes Chromatogramm neu hergestellt und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit Schwefelsäurereagenz derivatisiert, erhitzt und die Dokumentation bei 366 nm durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe identisch waren und die Banden auf der Platte parallel verliefen ohne Kurven oder Wellen. Die R_F -Werte der Banden von Astragalosid I, II und IV durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F -Einheiten von einander abweichen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnis der HPTLC-Laborpräzisionsuntersuchung

Für die repräsentativen Banden von Astragalosid I, II und IV ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 R_F -Werteinheiten; Bahn 1, 3, 5: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftragsvolumen; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

	Plattenbezeichnung			
	Platte 081022_01_01	Platte 081023_02_01	Platte 081023_01_01	
Bahn	R_F			ΔR_F
Astragalosid I	0,50	0,50	0,50	0,00
Astragalosid II	0,39	0,39	0,38	0,01
Astragalosid IV	0,26	0,26	0,26	0,00

Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Untersuchung der Laborpräzision akzeptiert werden.

3.1.1.4.7 Robustheit der Methode

Für die Prüfung der Robustheit der Methode wurde die Entwicklungstrecke der Platte variiert. Dabei wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung (50 mm) verglichen mit einer Platte, die 60 mm und einer weiteren, die 65 mm entwickelt wurde (Abb. 18 und 19). Die R_F -Werte der Astragaloside I, II und IV durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F -Einheiten voneinander abweichen.

Bei der Untersuchung der Robustheit bezüglich der Laufstrecke zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Der Test auf Robustheit für die Verwendung von HPTLC-Platten konnte damit akzeptiert werden.

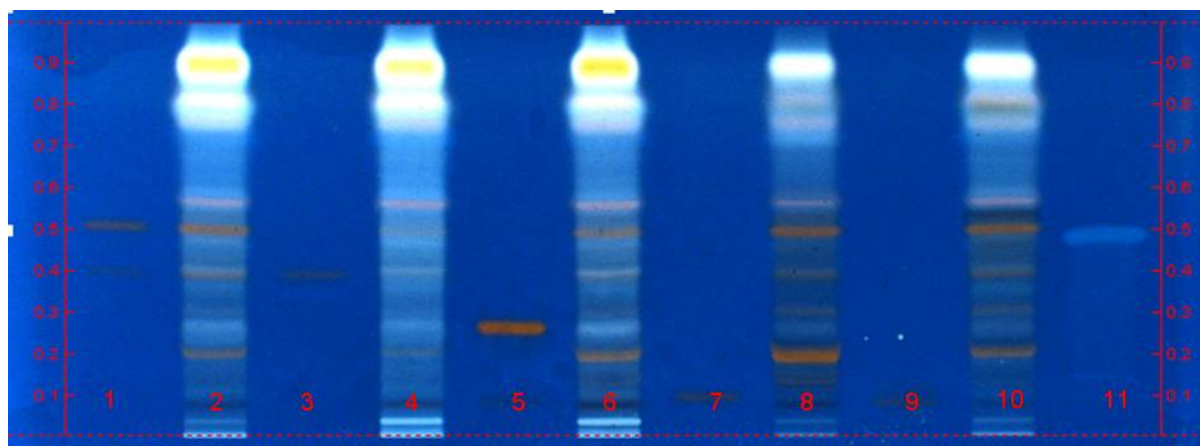


Abb. 18: HPTLC Entwicklungsstrecke 65 mm

Entwicklungsstrecke 65 mm; Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 µl Auftragsvolumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragsvolumen jeweils 12 µl; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

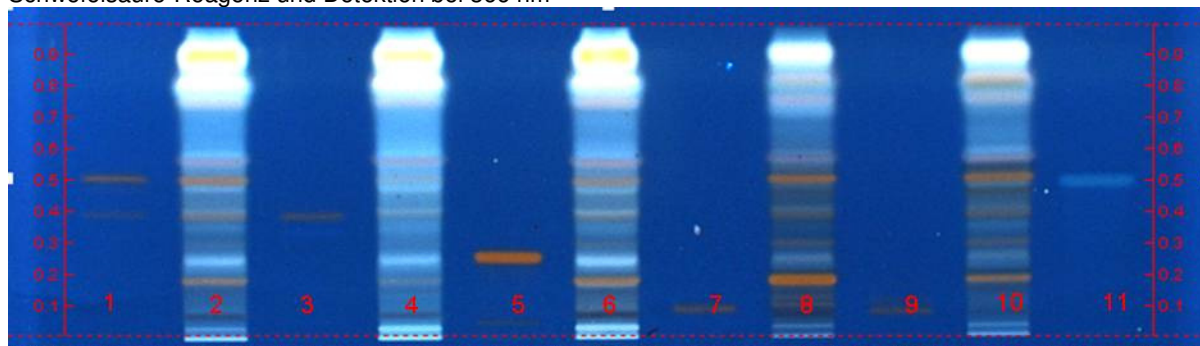


Abb. 19: HPTLC Entwicklungsstrecke 50 mm

Entwicklungsstrecke 50 mm; Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 µl Auftragsvolumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragsvolumen jeweils 12 µl; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

Tabelle 3: Robustheitsuntersuchung Laufstrecke

Für die repräsentativen Banden von Astragalosid I, II und IV ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 RF-Werteinheiten; Bahn 1, 3, 5: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV in dieser Reihenfolge, jeweils 2 µl Auftragsvolumen; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

	Plattenbezeichnung			
	081023_03_03 50 mm	081022_01_01 60 mm	081023_03_02 65 mm	
Bahn	R _F			ΔR _F
Astragalosid I	0,50	0,50	0,51	0,01
Astragalosid II	0,38	0,39	0,39	0,01
Astragalosid IV	0,26	0,26	0,26	0,00

Für eine Übertragung der Methode auf kieselgelbeschichtete DC-Aluminiumfolien wurde eine entsprechende Untersuchung durchgeführt. Als Ziellaufstrecke wurden 100 mm gewählt die vom Hersteller als optimale Trennstrecke angegeben wird. Für den Vergleich wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung verwendet. Die R_F-Werte der Astragaloside I,

II und IV durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F -Werteinheiten von einander abweichen (Abb. 20 und Tabelle 4).

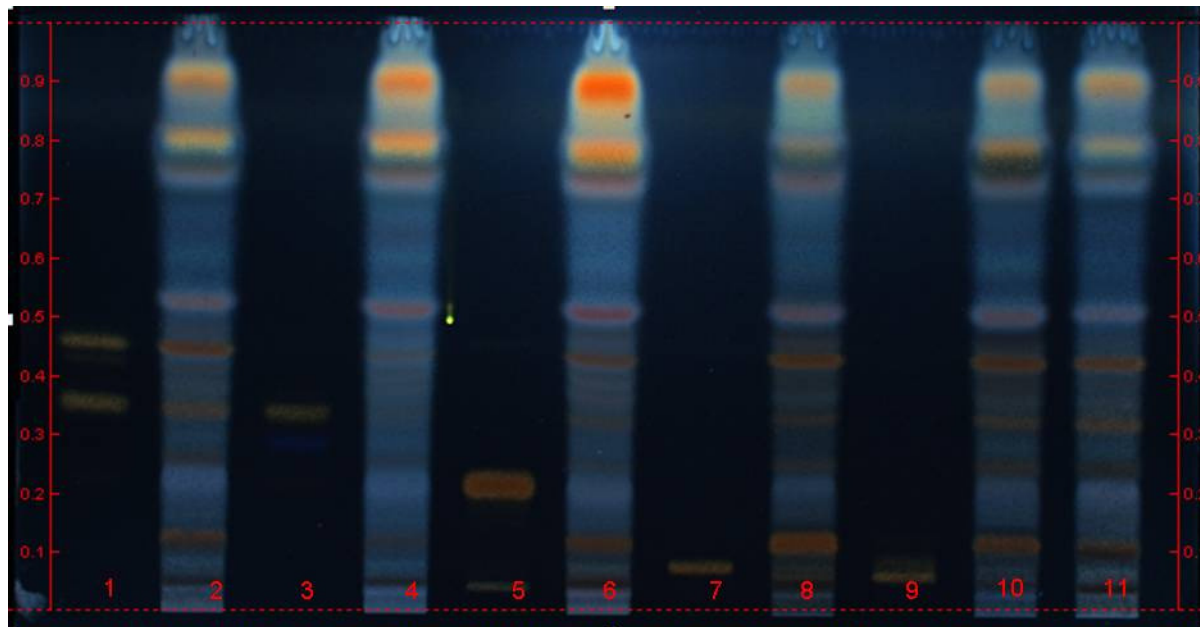


Abb. 20: DC Entwicklungsstrecke 100 mm

Entwicklungsstrecke 100 mm Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV, VI, VII und Daidzin in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftragsvolumen; Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Astragalusextrakte ArP1, ArP2, ArP3, ArP4, ArP5 Auftragsvolumen jeweils 12 μ l; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

Tabelle 4: Ergebnis der Robustheitsuntersuchung bezüglich des Plattenmaterials

Für die repräsentativen Banden von Astragalosid I, II und IV ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 R_F -Werteinheiten; Bahn 1, 3, 5: Referenzsubstanzen Astragalosid I, II, IV in dieser Reihenfolge, jeweils 2 μ l Auftragsvolumen; Fließmittel: Ethylacetat/ Methanol/ Wasser (100:20:10); Derivatisierung mit Schwefelsäure-Reagenz und Detektion bei 366 nm

	Plattenbezeichnung		
	Doppeltrogkammer DC-Alufolie	ADC2-Kammer HPTLC-Platte	
Bahn	R_F		ΔR_F
Astragalosid I	0,41	0,50	0,09
Astragalosid II	0,34	0,39	0,05
Astragalosid IV	0,22	0,26	0,04

Für die Entwicklung auf DC-Aluminiumfolien ergibt sich für das Astragalosid I ein R_F -Wertunterschied von $> 0,06$ R_F -Einheiten. Dies bedeutet, dass die Robustheit der Methode nicht ausreichend ist, um eine Übertragung auf das Plattenmaterial der DC-Aluminiumfolie vorzunehmen

3.1.2 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung nach Ph. Eur. (2008c) durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g Droge in ein Wägegglas genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Trocknungsverlust

MW [%]: Mittelwert des Trocknungsverlustes der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe					
	ARP 1	ARP 2	ARP 3	ARP 4	ARP 5	ARP 6
	Trocknungsverlust [%]					
1. Messung	10,02	6,83	9,66	9,57	10,78	8,56
2. Messung	10,01	7,50	9,75	9,77	10,69	8,64
3. Messung	9,99	6,79	9,73	9,87	10,81	8,70
MW [%]	10,00	7,04	9,71	9,73	10,76	8,63
STABWN [%]	0,01	0,33	0,04	0,13	0,05	0,06
Varianz [%]	0,00	0,11	0,00	0,02	0,00	0,00

3.1.3 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung nach Ph. Eur. (2008c) durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g pulverisierte Droge [355] in einen Quarztiegel genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet. Anschließend wird das Pulver im Muffelofen bei 600°C zur Massenkonstanz geglüht. (Tabelle 6)

Tabelle 6: Bestimmung der Asche

MW [%]: Mittelwert der Asche der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe				
	ARP 1	ARP 2	ARP 3	ARP 4	ARP 5
	Asche [%]:				
1. Messung	2,67	2,50	2,39	2,56	2,55
2. Messung	2,82	2,72	2,36	2,50	2,48
3. Messung	2,71	2,65	2,42	2,64	2,53
MW [%]	2,74	2,62	2,39	2,57	2,52
STABWN [%]	0,07	0,09	0,02	0,06	0,03
Varianz [%]	2,65	3,55	0,85	2,32	1,14

3.2 *Coptidis rhizoma*

Goldfadenwurzelstock ist das getrocknete Rhizom von *Coptis chinensis* FRANCH., *Coptis deltoidea* C.Y.CHENG & HSIAO oder *Coptis teeta* WALL. aus der Familie der Ranunculaceae. Die obigen Spezies werden der Reihenfolge nach als *Weilan*, *Yalian* bzw. *Yunlian* bezeichnet. Das Rhizom wird im Herbst ausgegraben, von den feinen Nebenwurzeln und anhaftendem Erdreich befreit und getrocknet. Nachträglich werden noch anhaftende Wurzelhaare entfernt.

3.2.1 Eigenschaften

Der Geruch der Droge ist eigentümlich, der Geschmack stark bitter und zusammenziehend.

3.2.2 Prüfung auf Identität

3.2.2.1 Makroskopische Prüfung

Die von verschiedenen Anbietern auf dem deutschsprachigen Markt erhältlichen Drogen lassen sich in zwei Gruppen teilen. Bei den Anbietern der Proben CrP 1 und CrP 2 waren die Drogen in kleine Stücke geschnitten. In den Proben CrP 3 und CrP4 waren die Rhizome in größere Stücke gebrochen (Abb. 21-24).

Die Rhizome des Anbieters der Probe CrP 1 waren quer zur Wachstumsachse geschnitten. Der Durchmesser der Rhizome lag zwischen 7 und 15 mm. Die Borke war gelbbraun gefärbt und uneben. Nodien waren nur schwer zu erkennen. Kleinere Wurzeln und Wurzelreste waren nicht zu erkennen. Der Holzteil war gut sichtbar, gelb-orange gefärbt und radial angeordnet. Das Mark war orange-rot bis braun gefärbt, bei dickeren Rhizomteilen war das Mark nur teilweise vorhanden oder hohl.

Die Rhizome des Anbieters der Probe CrP3 waren im spitzen Winkel zur Wachstumsachse geschnitten. Der Durchmesser der Rhizome lag zwischen 5 und 15 mm. Die Borke war gelbbraun gefärbt und es waren kleinere Wurzeln, Wurzelreste und Nodien mit Resten von Niederblättern und Narben von Niederblättern erkennbar. Der Holzteil war gut sichtbar, gelb-orange gefärbt und radial angeordnet. Das Mark war orange-rot bis braun gefärbt, bei dickeren Rhizomteilen war das Mark nur teilweise vorhanden oder hohl.

Die Rhizome der Proben CrP 3 und CrP 4 sind in Gruppen zusammenhängend, gebogen, und erinnern an „Hühnerfüsse“. Einzelne Rhizome waren 30 bis 60 mm lang und 3 bis 8 mm im Durchmesser. Die Rhizomoberfläche war gelb-braun bis gelb-grau gefärbt, viele kleine Nodien waren erkennbar wodurch die Oberfläche knotig-runzlig wurde. Kleine Wurzeln und Wurzelreste sind vorhanden. Dünnere Rhizomteile besaßen erkennbare Internodien mit

glatter Oberfläche. Vereinzelt waren an den Rhizomteilen Niederblätter und Narben von Niederblättern erkennbar. An den Rhizomenden fanden sich Sprossreste. Die Bruchstellen der harten Rhizome waren ungleichmäßig, die Borke war orange bis braun. Der Holzteil wurde erst sichtbar wenn die Rhizome gebrochen wurden. Dann war dieser gelb-orange gefärbt und radial angeordnet. Das Mark war orange-rot bis braun gefärbt, bei dickeren Rhizomteilen war das Mark nur teilweise vorhanden oder hohl.

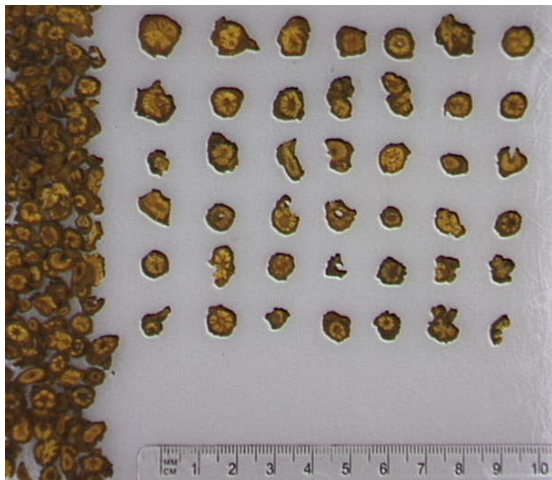


Abb. 21: CrP 1
Coptis chinensis, geschnitten, Ø 7-15 mm



Abb. 22: CrP 2
Coptis chinensis, geschnitten, Ø 5-15 mm



Abb. 23: CrP 3
Coptis chinensis, gebrochen, l: 30-60 mm, Ø 3-8 mm



Abb. 24: CrP 4
Coptis chinensis, gebrochen, l: 30-60 mm, Ø 3-8 mm

3.2.2.2 Mikroskopische Prüfung

Die Droge wurde mit einer Tischmühle zerkleinert (355), das gelbe Pulver mit Chloralhydrat-Reagenz aufgehellt und mikroskopiert.

Das Pulver von *Coptis chinensis* (Abb. 26, 27 und 28) zeigte folgende Merkmale: Korkfragmente, die in der Aufsicht fünf bis sechseckige braune Zellwände zeigen; Gefäßfragmente mit Tüpfelung, die regelmäßig in einer oder zweier Reihen angeordnet sind; parenchymatische Zellen mit gequollener Stärke; Steinzellen, teilweise im Verband, rund bis leicht eckig und einer Größe von 100 bis 50 µm und einem engen Lumen.

Das Pulver von *Coptis deltoidea* (Abb. 25) zeigte folgende Merkmale: Korkfragmente die in der Aufsicht fünf bis sechseckige braune Zellwände zeigen; Gefäßfragmente mit Tüpfelung die regelmäßig in einer oder zweier Reihen angeordnet sind; parenchymatische Zellen mit gequollener Stärke; Steinzellen teilweise im Verband, auffallend rechteckig und einer Größe von 75 bis 150 µm und einem weitem Lumen mit Zellwänden, die 5 bis 20 µm dick sind.

Das Pulver von *Coptis teeta* (ohne Abbildung) zeigte folgende Merkmale: Korkfragmente, die in der Aufsicht fünf- sechseckige braune Zellwände zeigen; Gefäßfragmente mit Tüpfelung die regelmäßig in einer oder zweier Reihen angeordnet sind; parenchymatische Zellen mit gequollene Stärkeballen; Steinzellen sind nicht vorhanden.

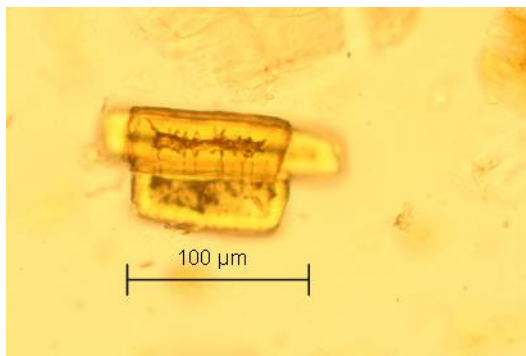


Abb. 25: Steinzelle *C. deltoidea*
Steinzellen rechteckig, Zellwänden dünnen

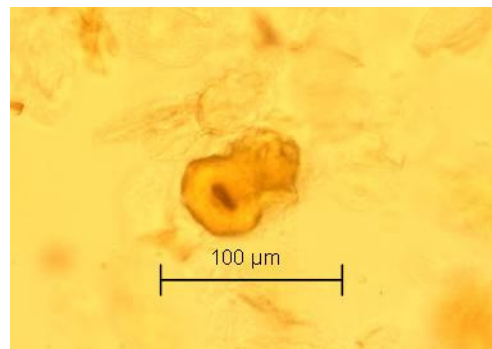


Abb. 26: Steinzelle *C. chinensis*
Steinzellen rund bis vieleckig, mit engem Lumen

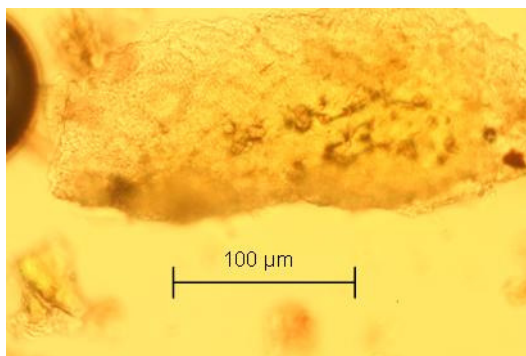


Abb. 27: Stärkeparenchym, *C. chinensis*
Stärkeparenchym mitgequollenen Stärkekörnern

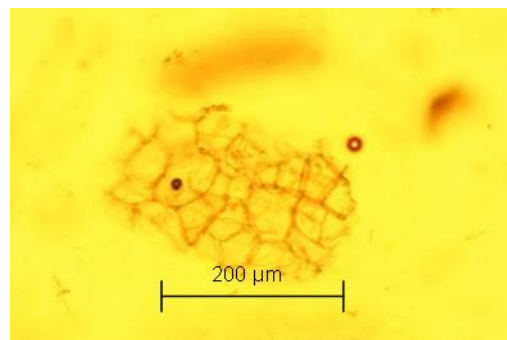


Abb. 28: Korkfragment, *C. chinensis*
Korkfragment in Aufsicht

3.2.2.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen I

Für die Identitätsprüfung sind bereits verschiedene Methoden entwickelt und in der Literatur beschrieben worden [AKIRA (1983)], LU (1985)], [ZHU(1985)].

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde die Methode der Ph.VR China gewählt, da sich damit eine sehr gute Trennung ohne Tailing der extrahierten Alkaloid-Fraktion erzielen liess. Es wurden in einem 100 ml Messkolben 100,0 mg pulverisierte Droge mit einer Mischung von Methanol R und Salzsäure R (100:1) versetzt und in einem Ultraschallbad 15 Minuten extrahiert. Ein aliquoter Teil wurde durch einen 0,45-µm-Spritzenfilter filtriert und das Filtrat zusammen mit den Referenzsubstanzen Jatrorrhizin, Palmatin, Berberin und Coptisin mit Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Sättigungskammer auf Kieselgel 60 HPTLC-Platten über eine Laufstrecke von 60 mm entwickelt.

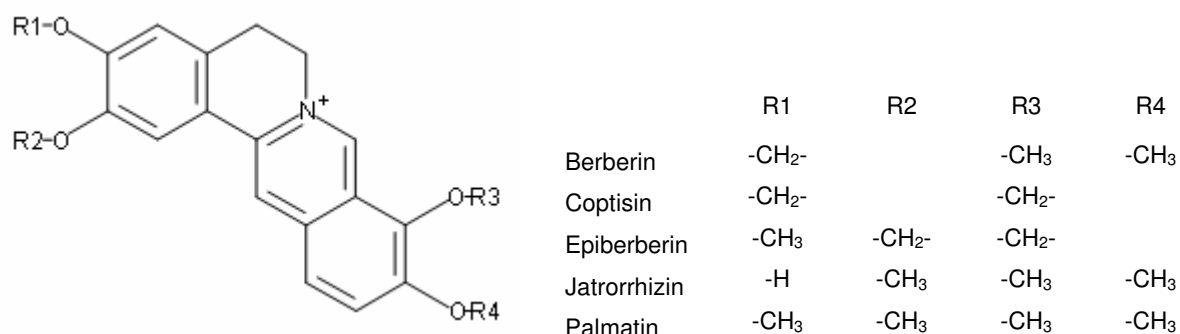


Abb. 29: Verwendete Isochinolinalkaloide

3.2.2.3.1 Stabilität der Untersuchungslösung während der Chromatographie

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde eine Lösung der Referenzsubstanzen punktförmig am Plattenrand aufgetragen und zunächst ein Mal entwickelt. Die Platte wird getrocknet, um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Coptisin und Palmatin lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden und es zeigten sich keine Abbauprodukte abseits der Winkelhalbierenden. Die Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde somit gezeigt (Abb. 31 und 33). Analyten, die durch chemische Prozesse bei der ersten Entwicklung verändert werden, zeigen veränderte chemische Eigenschaften, die sich bei der zweiten Entwicklung in einem anderen R_F-Wert auswirken und in einer Bande neben der Winkelhalbierenden resultieren.

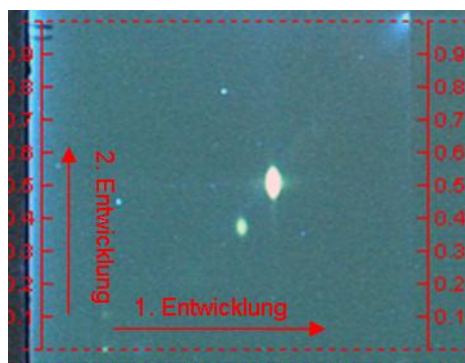


Abb. 30: 2-D Entwicklung Berberin

1 µl Berberinlösung (0,1 mg/ml) punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-mal entwickelt; Detektion bei 366 nm, Platte: Coptis_070803_02_01

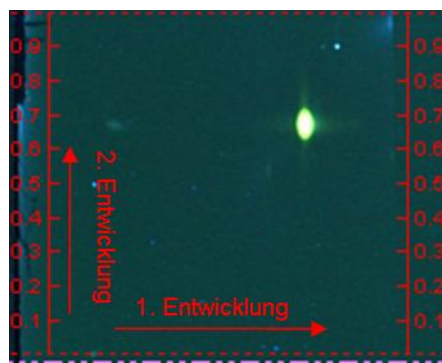


Abb. 31: 2-D Entwicklung Coptisin

1 µl Coptisinlösung (0,1 mg/ml) punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-mal entwickelt; Detektion bei 366 nm, Platte: Coptis_070803_02_02

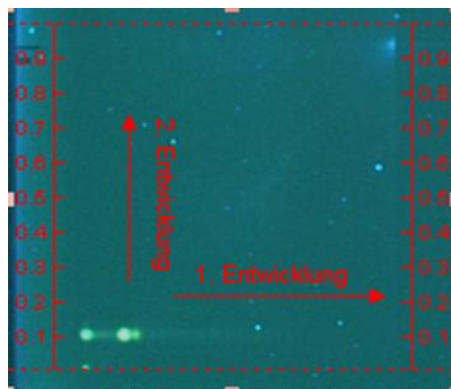


Abb. 32: 2-D Entwicklung Jatrorrhizin

1 µl Jatrorrhizinlösung (0,1 mg/ml) punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-mal entwickelt; Detektion bei 366 nm, Abbauprodukte erkennbar, Platte: Coptis_070803_02_03

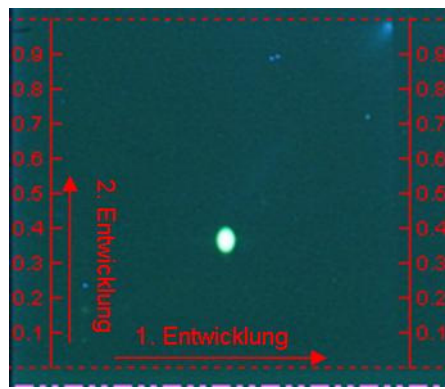


Abb. 33: 2-D Entwicklung Palmatin

1 µl Palmatinlösung (0,1 mg/ml) punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-mal entwickelt; Detektion bei 366 nm, Platte: Coptis_070803_04

Das Berberin (Abb. 30) zeigte eine Nebenbande auf der Winkelhalbierenden wobei es sich um Palmatin handelt die bedingt durch die Isolierung als Verunreinigung des Berberins zu betrachten ist. Für die Identifizierungsuntersuchung ist diese Verunreinigung aber nicht relevant. Das Jatrorrhizin ist nicht stabil und zeigt zwei unbekannte Nebenbanden (Abb. 32).

3.2.2.3.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für diese Prüfung wurden zwei Extrakte (wovon: *C. chinensis*) im Abstand von 2 h hergestellt (Abb. 34). Ein Aliquot des ersten Extrakts wurde sofort auf die Platte aufgetragen und die verbleibende Lösung verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine zweite Lösung wurde vor Ablauf der zwei Stunden hergestellt und zweimal direkt auf die Platte aufgetragen. Als vierte Bande wurde im Anschluss die zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrte Lösung aufgetragen. Nach Entwicklung und Dokumentation der Platte sollten

sich bei visueller Auswertung der einzelnen Bahnen des Fingerprints auf der Platte keine Unterschiede der Farben und Farbintensitäten der einzelnen Banden ergeben. Dies konnte im vorliegenden Fall belegt werden.

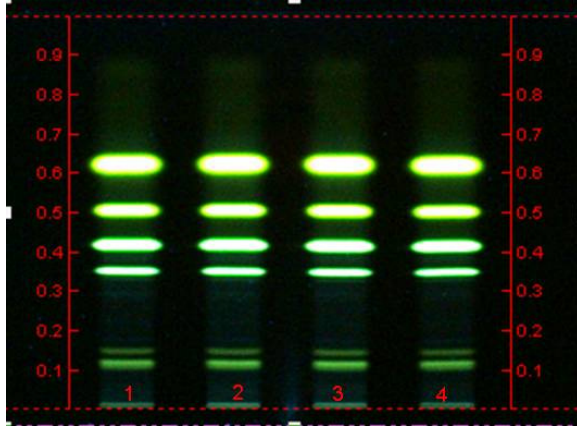


Abb. 34: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung

Bahn 1: Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen
 Coptis chinensis-Extrakt, Auftragevolumen jeweils 5 µl/ Bande; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung, Platte: 080715_02_01

3.2.2.3.3 Stabilität des Ergebnisses

Für die Beurteilung der Stabilität der Fluoreszenz nach Entwickeln der Platte wurde jeweils nach 5 Minuten, nach 30 Minuten und nach 60 Minuten (Abb. 34) eine Aufnahme bei 366 nm gemacht. Die Stabilität wurde akzeptiert wenn eine Auswertung nach 30 Minuten möglich war und keine starken Veränderungen der Farben und Farbintensität zu erkennen war. Die Stabilität der detektierbaren Fluoreszenz konnte akzeptiert werden.

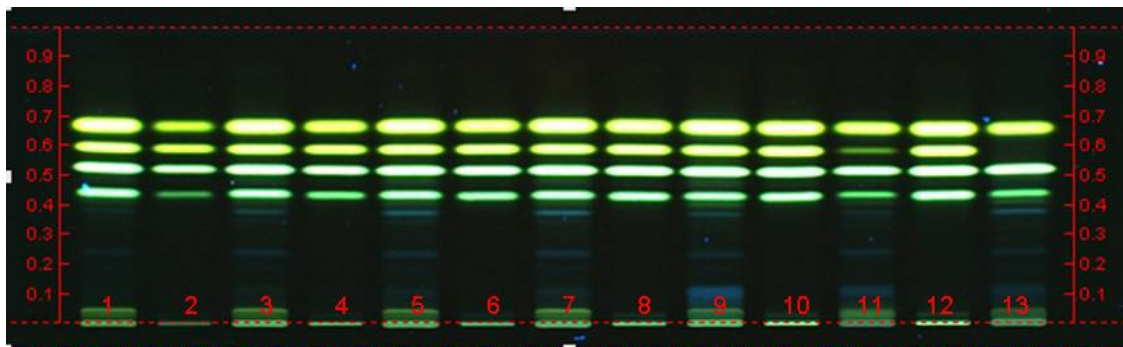


Abb. 35: Stabilität

Untersuchungslösungen Bahn 1,3,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*) ; Referenzsubstanzen Bahn 2,4,6,8,10,12: Level 1-6 (Mischung: Berberin [24,1-120,1 µg], Coptisin[5,0-25,0 µg], Epiberberin [7,5-28,1 µg], Palmatin [2,3-24,9 µg]; ca. äquidistante Verteilung); jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Aufnahme 60 Minuten nach Entwicklung, Platte: 080709_01_01_60

3.2.2.3.4 Spezifität der Methode

Zur Untersuchung der Spezifität der Methode wurden die Referenzsubstanzen und die Extrakte auf eine Platte aufgetragen und entwickelt (Abb. 36).

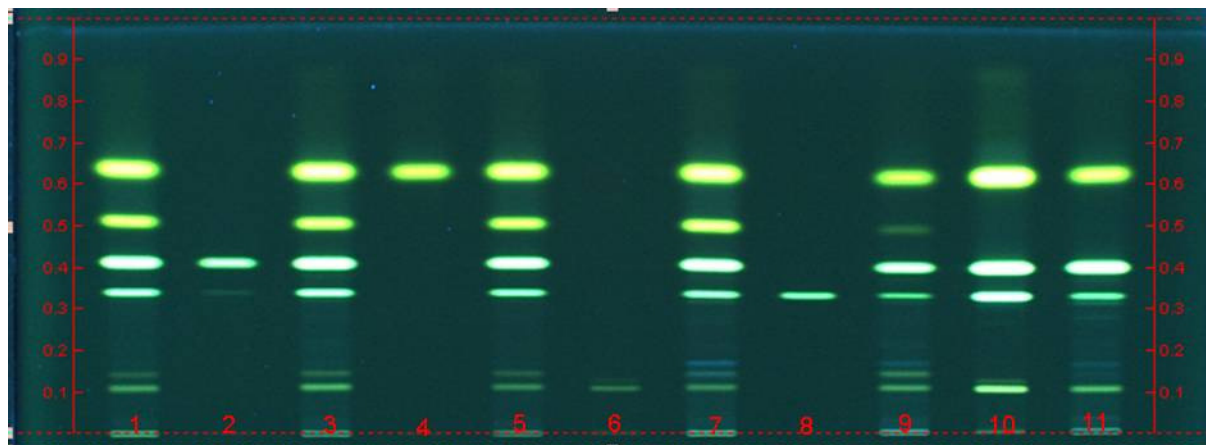


Abb. 36: Spezifität der Methode

Untersuchungslösungen Bahn 1,3,5,7,9,11: CrP1-CrP6 (CrP1-CrP5 [ohne CrP2] *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*) ; Referenzsubstanzen Bahn 2,4,6,8,10: Berberin 10 µl (25,6 ng), Coptisin 10 µl (11,7 ng), Jatrorrhizin 10 µl (10,1 ng), Palmatin 10 µl (11,2 ng), Mischung (Berberin [199,8 ng], Coptisin [400,0 ng], Jatrorrhizin [70,0 ng], Palmatin [2686 ng]) 4 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte ohne Derivatisierung bei 366 nm. Das Chromatogramm (Abb. 33) zeigt bei den Proben CrP1-CrP4 von *Coptis chinensis* (Bahnen: 1,3,5,7) die gleiche Abfolge von Banden. Bei den Proben von *Coptis deltoidea* (Bahn 9) und *Coptis teeta* (Bahn 11) ist die Bande von Epiberberin in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten [Wagner (2004)] nur schwach ausgeprägt (Bahn 9) bzw. nicht vorhanden (Bahn 11).

3.2.2.3.5 Detektion von Verunreinigungen

Zur Detektion von möglichen Verunreinigungen wurden Mahoniae caulis, Tinosporae radix und Phellodendri cortex ausgewählt, da diese Drogen ein Alkaloidspektrum ähnlich der *Coptis*-Arten aufweisen (Abb. 37).

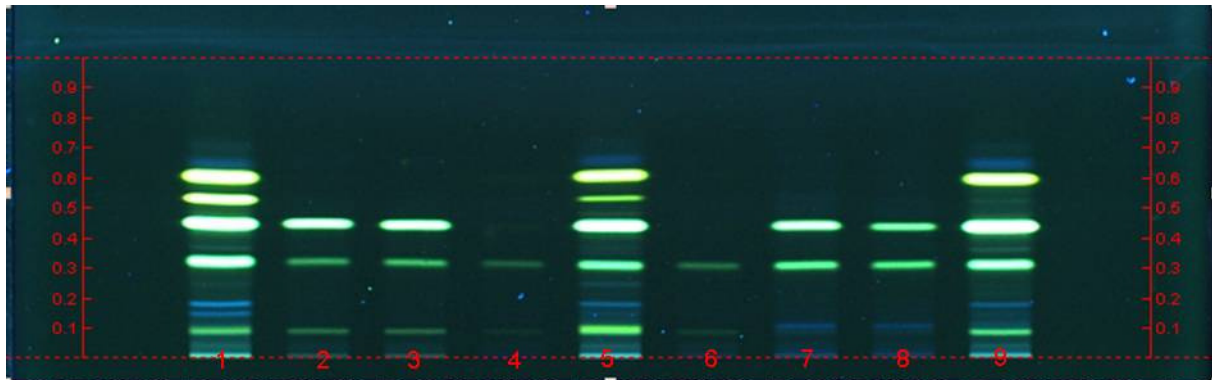


Abb. 37: HPTLC Prüfung auf Verunreinigungen

Bahn 1 *Coptidis chinensis* rhizoma, Bahn 2 *Mahonia caulis*, Bahn 3 *Mahonia caulis*, Bahn 4 *Tinosporae radix*, Bahn 5 *Coptidis deltoidea* rhizoma, Bahn 6 *Tinosporae radix*, Bahn 7 *Phellodendri cortex*, Bahn 8 *Phellodendri cortex*, Bahn 9 *Coptidis teeta* rhizoma; 4µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Für die Probe der chinesischen Mahonia (*Mahonia bealei*, Caulis) (Bahn 2 und 3) ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem von unten nach oben folgende Bandenabfolge: Jatrorrhizin (grün, R_F 0,11), Palmatin (grün, R_F 0,35), Berberin (leuchtendgrün, R_F 0,41). Die Banden von Jatrorrhizin und Palmatin waren im Vergleich zu den Proben der *Coptis*-Arten weniger intensiv. Die Banden von Coptisin und Epiberberin fehlten.

Für die Probe der *Tinosporae radix* (*Tinospora sagittata*, Radix) (Bahn 4 und 6) ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem von unten nach oben folgende Bandenabfolge: Jatrorrhizin (schwach grün, R_F 0,11), Palmatin (schwach grün, R_F 0,35). Die Banden von Jatrorrhizin und Palmatin waren im Vergleich zu den Proben der *Coptis*-Arten sehr viel weniger intensiv. Die Banden von Coptisin, Epiberberin und Berberin fehlten.

Für die Probe von *Phellodendri cortex*, *Phellodendron chinense* (Bahn 7 und 8) ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem folgende Bandenabfolge: Palmatin (grün, R_F 0,35), Berberin (leuchtendgrün, R_F 0,41). Die Bande von Palmatin war im Vergleich zu den Proben der *Coptis*-Arten weniger intensiv. Die Banden von Jatrorrhizin, Epiberberin und Coptisin fehlten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Zumischung bei gepulverten Drogen nur anhand eines Alkaloid-DC-Fingerprints sehr schwer zu erkennen ist. Da jedoch die Drogen als Ganz- bzw. Bruchdrogen gehandelt werden und die makroskopischen Merkmale sehr unterschiedlich sind, ist eine Verunreinigung mit entsprechenden Drogen leicht aufzudecken.

3.2.2.3.6 Wiederholpräzision

Für die Untersuchung der Wiederholpräzision (Abb. 38) wurden an einem Tag drei Chromatogramme unabhängig voneinander entwickelt. Die Untersuchungslösungen der

Probe CrP1 wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde die Dokumentation bei 366 nm ohne derivatisieren durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe identisch waren. Die Banden auf der Platte sollten parallel ohne Kurven oder Wellen verlaufen. Die R_F -Werte der Banden von Berberin, Coptisin und Palmatin durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,03 R_F -Einheiten voneinander abweichen.

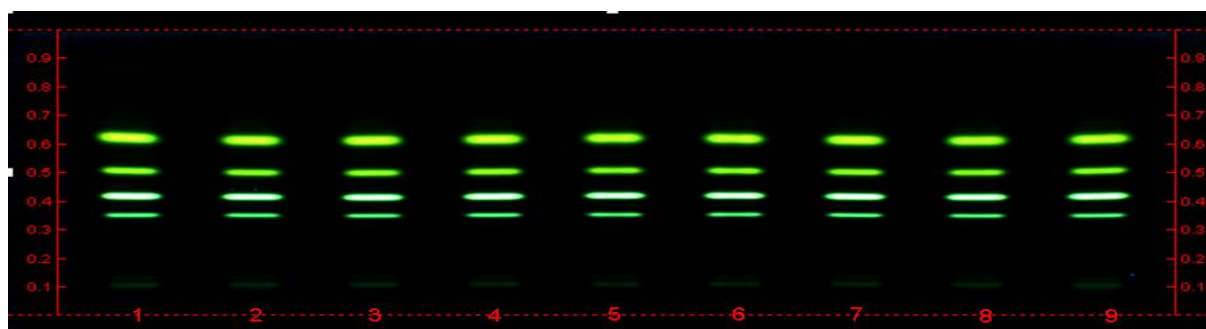


Abb. 38: Wiederholpräzision

Bahn 1-9 Probe CrP1 (*Coptis chinensis* Extrakt), Auftragsvolumen 10 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Tabelle 7: R_F -Werte der Platte: Coptis_070910_01_01

	Bahn									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MW
Bande	R_F									
Coptisin	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
Berberin	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Palmatin	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35

Tabelle 8: R_F -Werte der Platte Coptis_070910_01_02

	Bahn									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MW
Bande	R_F									
Coptisin	0,63	0,61	0,61	0,62	0,63	0,62	0,62	0,61	0,62	0,62
Berberin	0,42	0,41	0,41	0,42	0,42	0,42	0,41	0,42	0,41	0,42
Palmatin	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35

Tabelle 9: R_F -Werte der Platte Coptis_070910_01_03

	Bahn									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MW
Bande	R_F									
Coptisin	0,62	0,61	0,61	0,62	0,62	0,61	0,60	0,61	0,60	0,61
Berberin	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,42	0,43
Palmatin	0,36	0,36	0,36	0,37	0,37	0,37	0,36	0,36	0,36	0,36

Tabelle 10: R_F-Werte der Wiederholpräzision

	Plattenbezeichnung			
	Coptis_070910_01	Coptis_070910_01	Coptis_070910_01	
Bande	R _F			Δ R _F
Coptisin	0,62	0,61-0,63	0,60-0,62	0,03
Berberin	0,42	0,41-0,42	0,43-0,42	0,02
Palmatin	0,35	0,35	0,36-0,37	0,02

Die Ergebnisse der Wiederholpräzisionsuntersuchungen (Tab. 7-10) zeigten eine Schwankung der R_F-Werte, die aber noch innerhalb der geforderten Grenzen von 0,03 R_F-Einheiten lagen.

3.2.2.3.7 Laborpräzision

Für die Überprüfung der Laborpräzision wurde an drei aufeinander folgenden Tagen ein Chromatogramm eines Extraktes von *Coptis chinensis* (CrP1) entwickelt. Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde die Dokumentation bei 366 nm durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Identität identisch waren und die Banden auf der Platte parallel verliefen ohne Kurven oder Wellen. Die R_F-Werte der Banden von Coptisin, Berberin und Palmatin durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F-Werteinheiten von einander abweichen.

Tabelle 11: R_F-Werte der Platte Coptis_070911_01

Coptis_070911_01_01, Bahn 1-9 Coptis chinensis Extrakt, Auftragevolumen 10 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

	Bahn									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MW
Bahn	R _F									
Coptisin	0,63	0,62	0,62	0,63	0,63	0,62	0,62	0,61	0,63	0,62
Berberin	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Palmatin	0,36	0,36	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35

Tabelle 12: R_F-Werte der Platte Coptis_070912_01

Coptis_070912_01_01, Bahn 1-9 Coptis chinensis Extrakt, Auftragevolumen 10 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

	Bahn									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	MW
Bahn	R _F									
Coptisin	0,63	0,62	0,61	0,61	0,61	0,62	0,62	0,61	0,61	0,62
Berberin	0,43	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
Palmatin	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35

Tabelle 13: R_F-Werte der Laborpräzision

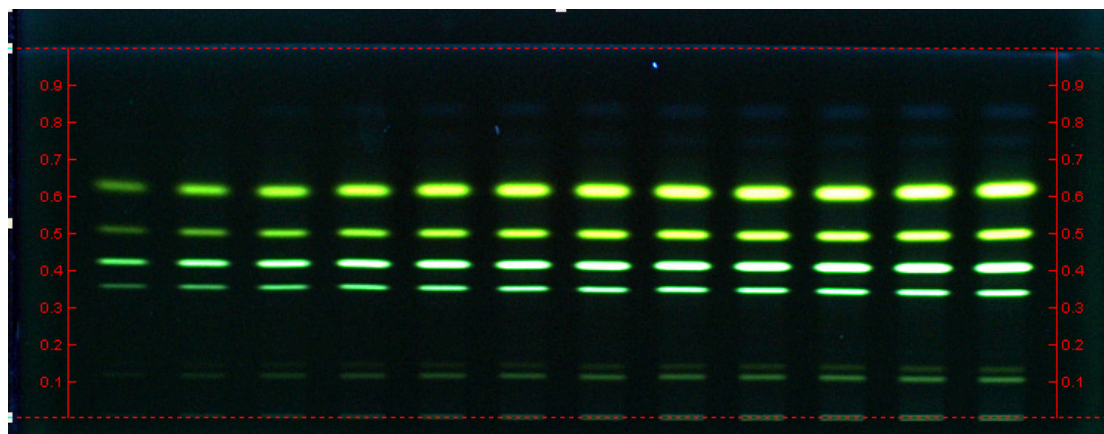
	Plattenbezeichnung			
	Coptis_070910_01	Coptis_070911_01	Coptis_070912_01	
Bande	R _F			Δ R _F
Coptisin	0,62	0,61-0,63	0,61-0,63	0,03
Berberin	0,42	0,42	0,43-0,42	0,02
Palmatin	0,35	0,35-0,36	0,35	0,02

Die Ergebnisse der Wiederholpräzisionsuntersuchungen (Tab. 11-13) zeigten eine Schwankung der R_F-Werte die aber noch innerhalb der geforderten Grenzen von 0,06 R_F-Einheiten liegen.

Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnten die Ergebnisse der Untersuchung zur Laborpräzision akzeptiert werden.

3.2.2.3.8 Robustheit

Für die Prüfung der Robustheit der Methode wurde die Entwicklungstrecke der Platte variiert. Es wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung mit einer Platte die 70 mm (Abb. 40) entwickelt wurde verglichen. Die R_F-Werte von Coptisin, Berberin und Palmatin durften um nicht mehr als 0,06 R_F-Werteinheiten von einander abweichen.

**Abb. 39: Robustheit 70 mm**

Platte Coptis_070810_01_01 Entwicklungstrecke 70 mm, Bahn 1-12 Probe CrP1(*Coptis chinensis* Extrakt), Auftragevolumen 1-12 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Tabelle 14: Zusammenfassung Robustheitsuntersuchung

	Plattenbezeichnung		
	Coptis_070810_01_01 (70 mm)	Coptis_070829_01_01 (65 mm)	
Bande	R _F		Δ R _F
Coptisin	0,62	0,63	0,01
Berberin	0,42	0,38	0,04
Palmatin	0,35	0,31	0,04

Die Ergebnisse der Wiederholpräzisionsuntersuchungen zeigten eine Schwankung der R_F -Werte, die aber noch innerhalb der geforderten Grenzen von 0,06 R_F -Werteinheiten lagen.

Da in der Methode der Pharmakopöe der Volksrepublik China mit Ammoniaklösung als Konditionierungsmittel gearbeitet wird, erschien der Einfluss der Konzentration als Überprüfungsparameter für die Robustheit als ebenfalls überprüfenswert. So wurde in einer zweiten Prüfung die 25%-ige Ammoniaklösung gegen 32%-ige Ammoniaklösung ausgetauscht. Die sonstigen Parameter blieben gleich (Abb. 40 und 41).

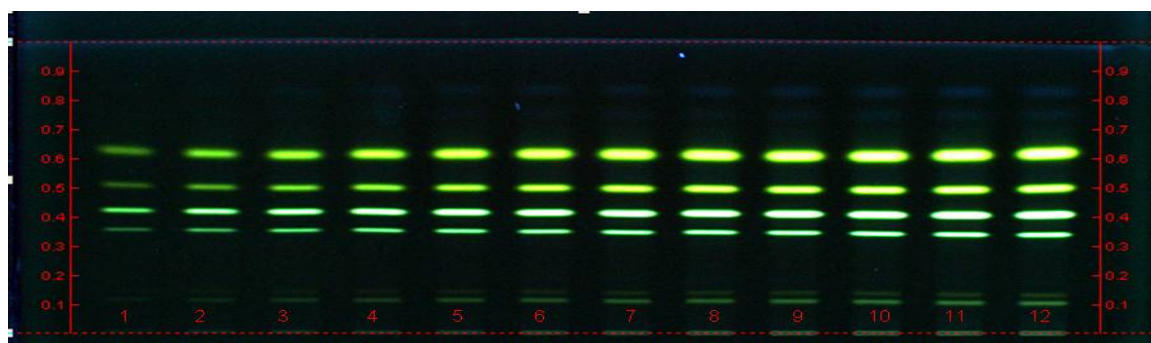


Abb. 40: HPTLC Robustheit (25% NH_3 -Lösung)

Platte Coptis_070831_01_02 mit 25%-iger Ammoniaklösung Entwicklungsstrecke 70 mm, Bahn 1-12 Probe CrP1(*Coptis chinensis* Extrakt), Auftragevolumen 1-12 μl ; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 25%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

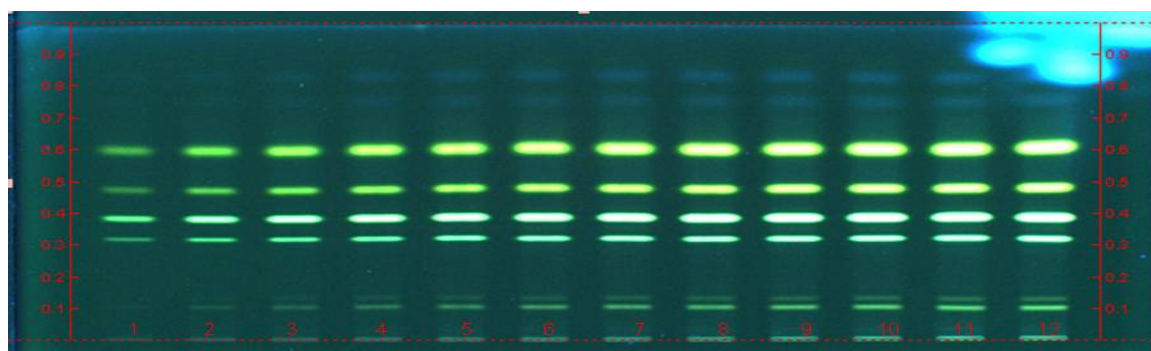


Abb. 41: HPTLC Robustheit (32% NH_3 -Lösung)

Platte Coptis_070830_01_01 mit 32 %-iger Ammoniaklösung Bahn 1-12 Probe CrP1(*Coptis chinensis* Extrakt), Auftragevolumen 1-12 μl ; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Tabelle 15: Ergebnis der Robustheitsuntersuchung

	Coptis_070831_01_02	Coptis_070830_01_01	
	R_F		ΔR_F
Coptisin	0,61	0,60	0,01
Berberin	0,41	0,39	0,02
Palmatin	0,34	0,32	0,02

Die Ergebnisse der Robustheitsuntersuchungen bezüglich der Ammoniakkonzentration (Tabelle 15) zeigten eine Schwankung der R_F -Werte die innerhalb der geforderten Grenzen

von 0,06 R_F -Einheiten lagen. Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Robustheit der Methode akzeptiert werden

3.2.2.4 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen II

Da in der Methode des Ph. VR China für *Rhizoma Coptidis* zur Plattenabstumpfung Ammoniaklösung eingesetzt wird der für den Routineeinsatz nur schwer zu handhaben ist, wurde für eine weitere Spezifitätsprüfung auf das Fließmittel von AKIRA (1983) zurückgegriffen.

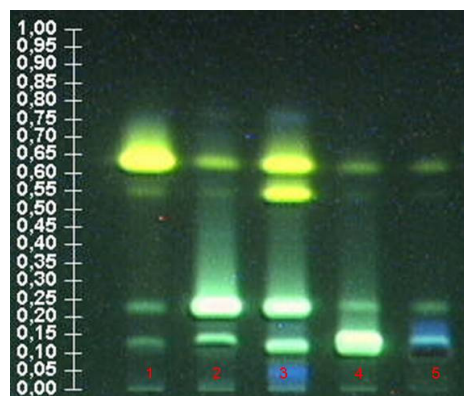


Abb. 42: Spezifität

Referenzsubstanzen Bahn 1 (Coptisin [1 mg/ml]), Bahn 2 (Berberin [1 mg/ml]), Bahn 4 (Palmatin [1 mg/ml]), Bahn 5 (Jatrorrhizin [1 mg/ml]); Extrakt: Bahn 4 (*C. chinensis*), Auftragevolumen 10 μ l; Fließmittel Ethylacetat, Toluol, Methanol, Diethylamin, Ammoniak (8:2:2:0,5:1)

Die Spezifität wurde durch den Vergleich der Referenzsubstanzen mit dem aufgetragenen Extrakt gezeigt. Die Spezifität für diese Methode konnte akzeptiert werden.

3.2.3 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung nach Ph. Eur (2008c) durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g Droge in ein Wägeglas genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet (Tab. 16).

Tabelle 16: Trocknungsverlust *Coptidis rhizoma*

MW [%]: Mittelwert des Trocknungsverlustes der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe		
	CrP1	CrP3	CrP4
	Trocknungsverlust [%]		
1. Einwaage	8,44	8,59	9,15
2. Einwaage	8,54	8,54	9,16
3. Einwaage	8,52	8,47	9,20
MW [%]	8,50	8,53	9,17
STABWN [%]	0,05	0,05	0,02
Varianz [%]	0,54	0,56	0,23

3.2.4 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung nach Ph. Eur (2008d) durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000g pulverisierte Droge [355] in einen Quarztiegel genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet. Anschließend wird das Pulver im Muffelofen bei 600°C zur Massenkonzanz geglüht (Tab. 17).

Tabelle 17: Bestimmung der Asche von *Coptidis rhizoma*

MW [%]: Mittelwert der Asche der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe					
	CrP1	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
	Asche [%]					
1. Einwaage	1,54	2,04	3,26	2,55	2,08	2,35
2. Einwaage	1,56	2,04	3,25	2,32	2,14	2,24
3. Einwaage	1,61	2,01	3,26	2,32	1,98	2,34
MW [%]	1,57	2,03	3,26	2,40	2,07	2,31
STABWN [%]	0,03	0,01	0,002	0,11	0,07	0,05
Varianz [%]	1,83	0,71	0,09	4,49	3,15	2,07

3.2.5 Gehaltsbestimmung von Isochinolinalkaloiden

Ausgangspunkt für die Gehaltsbestimmungen waren die Monographie *Coptidis rhizoma* aus der Ph. VR China (2005c) und die Monographie von WAGNER (2004).

3.2.5.1 Gehaltsbestimmung mittels HPTLC

Für die Gehaltsbestimmung mittels HPTLC und einem DC Scanner wurde die Methode der Ph. VR China gewählt, da sich mit dieser Methode eine Trennung der extrahierten Alkaloid-Fraktion erzielen lässt und bei der Validierung der Identitätsuntersuchung C zu guten Ergebnissen geführt hatte.

3.2.5.1.1 Stabilitätsuntersuchungen

3.2.5.1.1.1 Stabilität der Analyten während der DC

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde der Extrakt punktförmig am Plattenrand aufgetragen einmal entwickelt und getrocknet. Die Platte wurde um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Die Analyten der Untersuchungslösung lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden (Abb. 44). Es zeigten sich keine Abbauprodukte abseits der Winkelhalbierenden und die Stabilität der Analyten während der Chromatographie ist somit belegt.

Die Stabilität der Analyten wurde in der Validierung für die Identitätsprüfung C gezeigt, vergl. Kap. 3.2.2. Für die Quantifizierung wurde im Vergleich zu bisher publizierten Methoden zusätzlich Epiberberin herangezogen. Die Stabilität wurde im Extrakt geprüft.

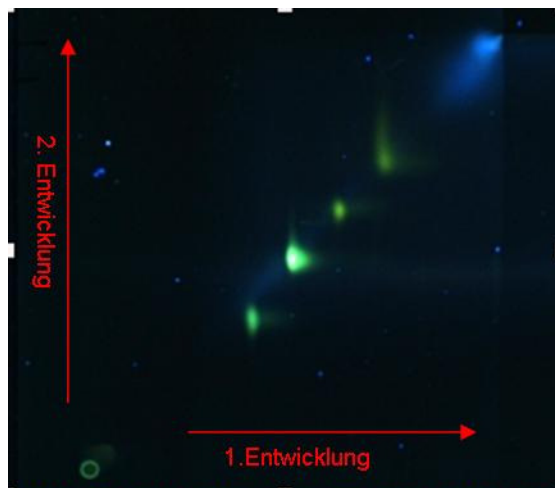


Abb. 43: 2D-Entwicklung

1 µl *Coptidis rhizoma* Extrakt punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2.-mal entwickelt, UV 366 nm, Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung Platte Coptis_070803_02_03

Die Substanzen Coptisin, Epiberberin, Berberin und Palmatin (absteigende R_F -Werte) lagen auf der Winkelhalbierenden, die „Sternbildung“ der Substanzen ist auf ein Fronting zurückzuführen und beruht auf einem Konzentrationseffekt.

3.2.5.1.1.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für diese Prüfung wurden zwei Extrakte im Abstand von 2 h hergestellt. Ein Aliquot des ersten Extraktes wurde sofort auf die Platte aufgetragen. Die verbleibende Lösung wurde verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine zweite Lösung wurde bis zum Ablauf der 2 h hergestellt. Diese Lösung wurde zweimal sofort auf die Platte aufgetragen. Als vierte Bahn wurde im Anschluss die 2 h bei Raumtemperatur aufbewahrte Lösung aufgetragen. Nach Entwickeln und Dokumentieren der Platte (Abb. 45) durften sich bei Auswertung der Banden von Coptisin, Berberin, Epiberberin und Palmatin mit dem DC Scanner die Signalwerte der Peakflächen um nicht mehr als 15%, bezogen auf die frisch hergestellten Lösungen, verändern.

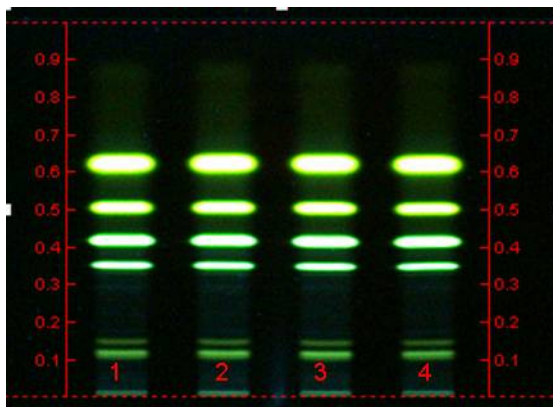


Abb 44: Stabilität der Extraktionlösung

Bahn 1: Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen
 Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung Platte: 080715_02_01

Tabelle 18: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen

Bahn 1-4 Probe CrP1 (*Coptis chinensis* Extrakt), Auftragsvolumen 5 µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Iso-propanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; MW Bahn 2+3 = Mittelwert der Signalwerte von Bahn 2 und 3

	Signalwert [mAU]	Einwaage [mg]	Signalwert [mAU/100mg]	MW Bahn 2+3 [mAU/100mg]	Signalwert/ MW Bahn 2+3
Berberin					
Bahn 1	15065	101,3 mg	14871	14938	1,00
Bahn 2	15486	102,7 mg	15079		1,01
Bahn 3	15197	102,7 mg	14798		0,99
Bahn 4	13828	101,3 mg	13650		0,91
Coptisin					
Bahn 1	47562	101,3 mg	46951	47745	0,98
Bahn 2	49712	102,7 mg	48405		1,01
Bahn 3	48358	102,7 mg	47086		0,99
Bahn 4	44503	101,3 mg	43932		0,92
Epiberberin					
Bahn 1	22238	101,3 mg	21953	22576	0,97
Bahn 2	23591	102,7 mg	22971		1,02
Bahn 3	22780	102,7 mg	22181		0,98
Bahn 4	20469	101,3 mg	20206		0,90
Palmatin					
Bahn 1	3663	101,3 mg	3616	3506	1,03
Bahn 2	3668	102,7 mg	3571		1,02
Bahn 3	3534	102,7 mg	3441		0,98
Bahn 4	3105	101,3 mg	3065		0,87

Die auf Bahn 2 und 3 aufgetragenen Untersuchungslösungen zeigten im Beispiel Palmatin Schwankungen um bis zu 4 % bezogen auf den Mittelwert. Für die Probe die sich 2 h in Lösung befindet zeigen sich Abweichungen von ca. 10%. Die Substanz Palmatin zeigt mit 13% die stärkste Signalabnahme (Tabelle 18).

Zwar können die Abweichungen akzeptiert werden, jedoch ist zu empfehlen die Lösungen sehr zeitnah zur Extraktion zu verwenden.

3.2.5.1.1.3 Stabilität der Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden mit frisch hergestellten Extrakten und Referenzsubstanzmischungen durchgeführt. Nach Entwicklung und Dokumentation der Platte durften sich bei Auswertung der Banden von Coptisin, Berberin, Epiberberin und Palmatin die Signalwerte der Peakflächen um nicht mehr als 10%, bezogen auf den Anfangswert, verändern. Als Markersubstanz wurde Berberin verwendet. Die Messungen wurden nach 0, 5, 10, 30 und 60 Minuten durchgeführt (Tabelle 19, Abb. 46 und 47).

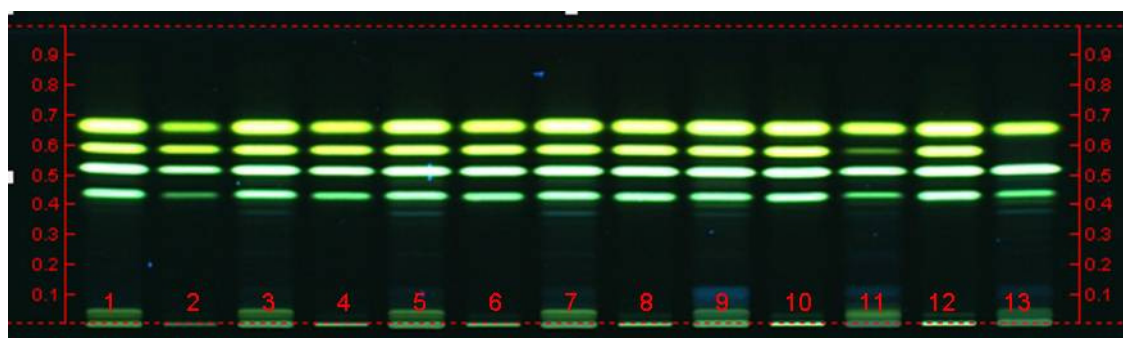


Abb. 45: Coptidis rhizoma, Stabilität des Ergebnis, T₀

Untersuchungslösungen Bahn 1,3,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*) ; Referenzsubstanzen Bahn 2,4,6,8,10,12: Level 1-6 (Mischung: Berberin [24,1-120,1 µg], Coptisin[5,0-25,0 µg], Epiberberin [7,5-28,1 µg], Palmatin [2,3-24,9 µg]; ca. äquidistante Verteilung); jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Platte 080709_01

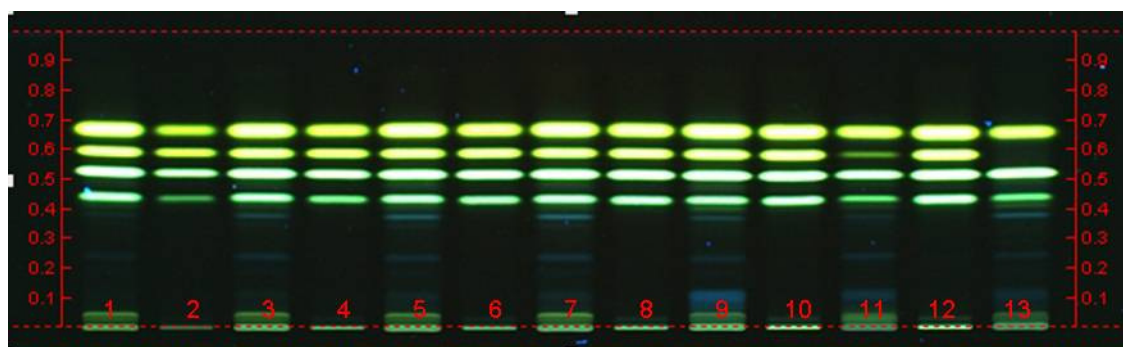


Abb. 46: Coptidis rhizoma, Stabilität des Ergebnis, T₆₀

Untersuchungslösungen Bahn 1,3,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*) ; Referenzsubstanzen Bahn 2,4,6,8,10,12: Level 1-6 (Mischung: Berberin [24,1-120,1 µg], Coptisin[5,0-25,0 µg], Epiberberin [7,5-28,1 µg], Palmatin [2,3-24,9 µg]; ca. äquidistante Verteilung); jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Platte 080709_01

Tabelle 19: Zusammenfassung: Stabilität der Ergebnisse

Marker: Berberin	Signal (T=0 min)	Signal (T=5 min)	Signal (T=10 min)	Signal (T=30 min)	Signal (T= 60 min)	Verhältnis T=0/T=30	Verhältnis T=0/T=60
Bahn 1	11182,4	11214,9	11139,6	11220,0	10945,4	1,00	0,98
Bahn 2	3983,4	4054,8	4051,7	4050,4	3976,1	1,02	1,00
Bahn 3	10737,3	10797,5	10781,0	10793,1	10404,9	1,01	0,97
Bahn 4	6923,0	7098,5	7156,3	7167,4	6976,4	1,04	1,01
Bahn 5	10893,0	12838,1	11129,3	11081,6	10686,6	1,02	0,98
Bahn 6	8726,1	8998,5	9540,3	8827,8	8659,3	1,01	0,99
Bahn 7	11953,6	12034,7	11993,5	12010,5	11742,3	1,00	0,98
Bahn 8	11034,0	11220,0	11197,2	11196,1	10883,5	1,01	0,99
Bahn 9	12633,0	12729,0	12702,8	12684,3	12290,6	1,00	0,97
Bahn 10	12941,6	13028,8	12997,9	12980,8	12567,9	1,00	0,97
Bahn 11	7158,0	7216,6	7189,6	7162,4	7068,1	1,00	0,99
Bahn 12	13493,3	13692,8	13649,9	13712,0	13298,4	1,02	0,99
Bahn 13	12248,6	12019,9	11986,1	12031,9	11644,2	0,98	0,95

Die Ergebnisse der densitometrischen Untersuchungen sanken innerhalb einer ½ Stunde um ca. 2% und innerhalb 1 Stunde um 5% ab (Tabelle 1). Die Stabilität konnte akzeptiert werden.

3.2.5.1.2 Spezifität der Methode

3.2.5.1.2.1 Identifizierung von *Coptidis rhizoma* Proben durch Vergleich mit authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Da für die Untersuchungen keine authentischen Drogenproben vorliegen, wurde die Untersuchung mit allen vorliegenden *Coptis spec.* durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit frisch hergestellten Extrakten und Referenzmischungen durchgeführt. Nach Entwickeln und Dokumentieren der Platte mussten die Banden von Coptisin, Berberin, Epiberberin und Palmatin in den Extrakten deutlich getrennt sein und die Spezies *Coptis chinensis* mussten bezüglich der Banden von Coptisin, Epiberberin, Berberin und Palmatin ähnliche Intensitäten aufweisen. Für *C. deltoidea* und *C. teeta* sind geringere Gehalte in der Literatur beschrieben [WAGNER (2004)] entsprechend sind hier weniger intensive Banden zu erwarten.

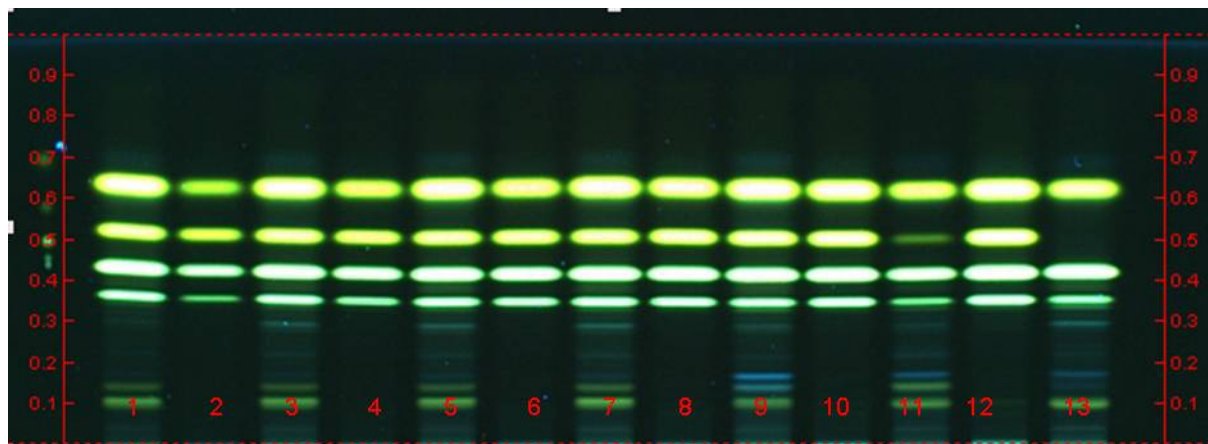


Abb. 47: Vergleich Extrakte mit Referenzsubstanzen

Untersuchungslösungen Bahn 1,3,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*) ; Referenzsubstanzen Bahn 2,4,6,8,10,12: Level 1-6 (Mischung: Berberin [24,1-120,1 µg], Coptisin [5,0-25,0 µg], Epiberberin [7,5-28,1 µg], Palmatin [2,3-24,9 µg]; ca. äquidistante Verteilung); jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Platte: 080710_01_01

Abb. 48 zeigt die Auswertung des Bandenmusters ohne Derivatisierung bei UV 366 nm. Das Chromatogramm zeigt bei den Proben von *Coptis chinensis* (Bahnen: 1,3,5,7,9) die gleiche Abfolge von Banden. Bei den Proben von *Coptis deltoidea* (Bahn 11) und *Coptis teeta* (Bahn 13) ist die Bande von Epiberberin nur schwach (Bahn 11) bzw. nicht vorhanden (Bahn 13).

Dieses Ergebnis befindet sich im Einklang mit denen bei WAGNER (2004). Ohne authentische Drogenproben ist die Aussagekraft der Untersuchung jedoch eingeschränkt.

3.2.5.1.2.2 Nachweis von Verfälschungen

Die Methode ist für *Coptis chinensis*, *C. deltoidea*, *C. teeta* spezifisch, wenn das Fingerprint-Chromatogramm der Verfälschungen (Mahoniae caulis, Tinospora radix, Phellodendri cortex) signifikant unterschiedlich ist zu dem Fingerprint-Chromatogramm der Rhizomdrogen *Coptis chinensis*, *C. deltoidea*, *C. teeta* bezüglich der Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Banden.

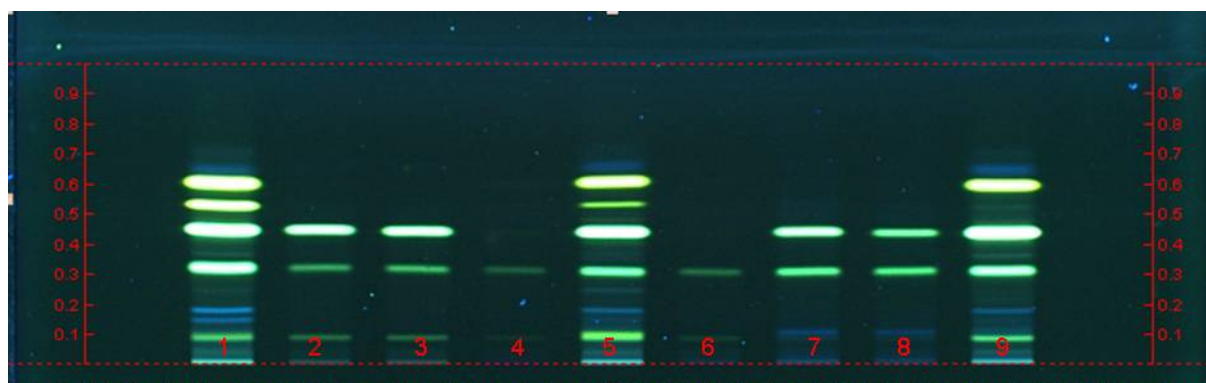


Abb. 48: Detektion von Verfälschungen

Bahn 1 Coptidis chinensis rhizoma, Bahn 2 Mahonia caulis, Bahn 3 Mahonia caulis, Bahn 4 Tinosporae radix, Bahn 5 Coptidis deltoidea rhizoma, Bahn 6 Tinosporae radix, Bahn 7 Phellodendri cortex, Bahn 8 Phellodendri cortex, Bahn 9 Coptidis teeta rhizoma; 4µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Für die chinesische Mahonia (Caulis Mahoniae, *Mahonia bealai*) (Bahn 2 und 3) ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem von unten nach oben folgende Bandenabfolge: Jatrorrhizin (grün, R_F 0,11), Palmatin (grün, R_F 0,35), Berberin (leuchtendgrün, R_F 0,41). Die Banden von Jatrorrhizin und Palmatin waren im Vergleich zu den Proben der *Coptis*-Arten weniger intensiv. Die Banden von Coptisin und Epiberberin fehlten.

Für Tinosporae sinensis radix (*Tinospora sinensis*) (Bahn 4 und 6) ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem von unten nach oben folgende Bandenabfolge: Jatrorrhizin (schwach grün, R_F 0,11), Palmatin (schwach grün, R_F 0,35). Die Banden von Jatrorrhizin und Palmatin waren im Vergleich zu den Proben der *Coptis*-Arten sehr viel weniger intensiv. Die Banden von Coptisin, Epiberberin und Berberin fehlten.

Für Phellodendri cortex (*Phellodendron chinense*) auf Bahn 7 und 8 ergab sich bei dem gewählten Entwicklungssystem von unten nach oben folgende Bandenabfolge: Palmatin (grün, R_F 0,35), Berberin (leuchtendgrün, R_F 0,41). Die Bande von Palmatin war im Vergleich

zu den Proben der *Coptis*-Arten weniger intensiv. Die Banden von Jatrorrhizin, Epiberberin und Coptisin fehlten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Zumischung von gepulverten Drogen nur schwer unterscheidbar ist. Da die Drogen des Handels als Ganz- bzw. Bruchdrogen vorliegen und die makroskopischen Merkmale sehr unterschiedlich sind ist eine Verunreinigung mit entsprechenden Drogenorganen leicht aufzudecken.

3.2.5.1.3 Kalibrierung

3.2.5.1.3.1 Messbereich

Für die Quantifizierung von Coptisin, Epiberberin, Berberin und Palmatin in Proben von *Coptis chinensis*, *C. deltoidea* und *C. teeta* unbekannten Gehalts musste zunächst der Messbereich festgelegt werden.

Vorversuch: Auf eine HPTLC-Platte (Abb. 49) wurden die Untersuchungslösungen und Referenzsubstanzen (Coptisin, Epiberberin, Berberin und Palmatin) jeweils einzeln mit bekannter Konzentration aufgetragen (Ergebnisse Tab. 20). Es wurde dabei angenommen, dass sich das Detektorsignal und die aufgetragenen Proben-/ Referenzmengen proportional verhalten.

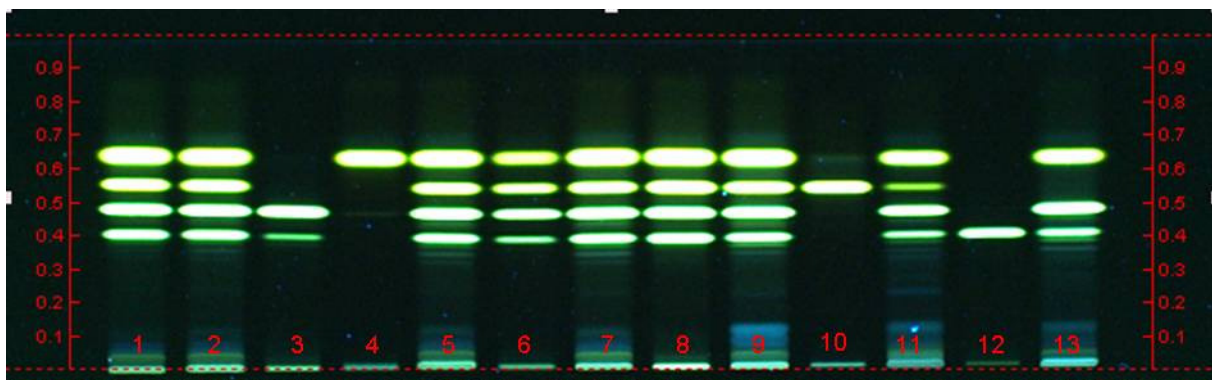


Abb. 49: Vorversuch Messbereich *Coptidis rhizoma*

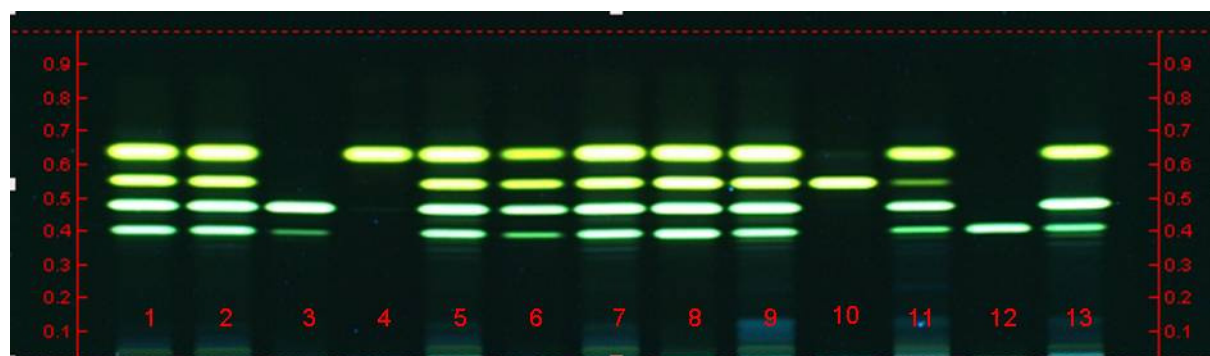
Untersuchungslösungen Bahn 1,2,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*); Referenzsubstanzen Bahn 3,4,6,8,10,12: Berberin Level 3 (350ng), Coptisin Level 3 (84,5ng), Level 1 Mischung (Berberin [124 ng], Coptisin [25,5 ng], Epiberberin [37,5 ng], Palmatin [12 ng]), Level 6 (Mischung: Berberin [598,5 ng], Coptisin [126,5 ng], Epiberberin [164,5 ng], Palmatin [150,5 ng]), Epiberberin Level 3 (113,5 ng), Palmatin Level 3 (93 ng); Auftragevolumen jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Methanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Konditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Platte 080709_01

Tabelle 20: Ergebniszusammenfassung Vorversuch Coptidis rhizoma

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*); Referenzsubstanzen Bahn 3,4,6,8,10,12: Berberin Level 3 (350ng), Coptisin Level 3 (84,5ng) , Level 1 Mischung (Berberin [124 ng], Coptisin [25,5 ng], Epiberberin [37,5 ng], Palmatin [12 ng], Level 6 (Mischung: Berberin [598,5 ng], Coptisin[126,5 ng], Epiberberin [164,5 ng], Palmatin [150,5 ng]), Epiberberin Level 3 (113,5 ng), Palmatin Level 3 (93 ng); Auftragsvolumen jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung; Platte 080709_01

	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin
Bahn	Signal [mAU]				Substanzmenge [ng]			
1 (Extrakt)	11265	35613	17854	2884	-	-	-	-
2 (Extrakt)	11372	34875	17449	3197	-	-	-	-
3 (Level 3)	11300	-	-	-	350,0	-	-	-
4 (Level 3)	-	29396	-	-	-	84,5	-	-
5 (Extrakt)	10979	34774	16654	2845	-	-	-	-
6 (Level 1)	5423	10696	8800	670	124,0	25,5	37,5	12,5
7 (Extrakt)	12654	40675	18898	3424	-	-	-	-
8 (Level 6)	15388	41647	32747	5520	598,5	126,5	164,5	150,5
9 (Extrakt)	13352	43106	23193	2917	-	-	-	-
10 (Level 3)	-	-	24596	-	-	-	113,5	-
11 (Extrakt)	7102	18676	1875	1006	-	-	-	-
12 (Level 3)	-	-	-	3267	-	-	-	93,0
13 (Extrakt)	12667	20667	-	1765	-	-	-	-

Zum Festlegen des Messbereichs wurde der Mittelwert aus den Mengen an Coptisin, Epiberberin, Berberin und Palmatin in den unbekannten Proben berechnet und als „Mitte“ des Messbereichs festgelegt. Der Messbereich wurde als: [„Mitte“ \pm 50 %] (50-150%) festgelegt. Es wurden entsprechende sechs verschiedene (äquidistante) Mengen der Kalibrierlösungen (Mischung der einzelnen Referenzsubstanzen) auf eine weitere Platte aufgetragen (Abb. 50) und mit den Untersuchungslösungen vermessen. Die Ergebnisse (Tab. 21) zeigten, dass der Arbeitsbereich mit den gewählten Konzentrationen abgedeckt ist. Für Epiberberin und Palmatin wurde die „Level 6“ Konzentration (Tabelle 20) gestrichen und der Bereich Level 1 bis Level 5 neu unterteilt.

**Abb. 50: Messbereich Platte Coptidis rhizoma**

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*); Referenzsubstanzen Bahn 3,4,6,8,10,12: Berberin Level 3 (299,5ng), Coptisin Level 3 (65 ng) , Level 1 Mischung (Berberin [120,5 ng], Coptisin [25,0 ng], Epiberberin [37,5 ng], Palmatin [11,5 ng], Level 6 (Mischung: Berberin [600,5 ng], Coptisin[125,0 ng], Epiberberin [140,5 ng], Palmatin [95 ng]), Epiberberin Level 3 (75 ng), Palmatin Level 3 (55 ng); Auftragsvolumen jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

Tabelle 21: Ergebniszusammenfassung für den Messbereich Versuch (Coptis)

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,5,7,9,11,13: CrP1-CrP7 (CrP1-CrP5 *C. chinensis*, CrP6 *C. deltoidea*, CrP7 *C. teeta*); Referenzsubstanzen Bahn 3,4,6,8,10,12: Berberin Level 3 (299,5ng), Coptisin Level 3 (65 ng) , Level 1 Mischung (Berberin [120,5 ng], Coptisin [25,0 ng], Epiberberin [37,5 ng], Palmatin [11,5 ng], Level 6 (Mischung: Berberin [600,5 ng], Coptisin [125,0 ng], Epiberberin [140,5 ng], Palmatin [95 ng]), Epiberberin Level 3 (75 ng), Palmatin Level 3 (55 ng); Auftragevolumen jeweils 5µl; Fließmittel Toluol/ Ethylacetat/ Isopropanol/ Metahanol/ Wasser (60/30/15/15/3) und 32%-iger Ammoniaklösung in der Koniditionierungskammer; Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung

	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin
	Signal [mAU]				Substanzmenge [ng]			
1 (Extrakt)	15238	39408	19147	3566	-	-	-	-
2 (Extrakt)	14663	36798	17650	3439	-	-	-	-
3 (Level 3)	12444	-	-	-	299,5	-	-	-
4 (Level 3)	-	27900	-	-	-	65,0	-	-
5 (Extrakt)	15074	40684	18670	3424	-	-	-	-
6 (Level 1)	5406	9929	10303	639	120,5	25,0	37,5	11,5
7 (Extrakt)	16187	45190	19844	3752	-	-	-	-
8 (Level 6)	21776	56175	36851	2815	600,5	125,0	140,5	24,0
9 (Extrakt)	17494	51125	26027	3465	-	-	-	-
10 (Level 3)	-	-	20150	-	-	-	75,0	-
11 (Extrakt)	9607	22614	1859	1373	-	-	-	-
12 (Level 3)	-	-	-	2815	-	-	-	55,0
13 (Extrakt)	17132	23639	-	2173	-	-	-	-

Tabelle 22: Hergestellte Konzentrationen für Coptis Alkaloide

	Konzentrationen (Level 1-6)					
	1	2	3	4	5	6
Substanz	Menge [µg/ml]					
Berberin	24,1	42,8	59,9	81,8	100,0	120,1
Coptisin	5,0	9,0	13,0	17,0	21,0	25,0
Epiberberin	7,5	11,6	15,0	20,0	23,9	28,1
Palmatin	2,3	6,7	11,0	15,3	19,7	24,0

3.2.5.1.3.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des in Kapitel 3.2.5.1.3 beschriebenen Kalibriersystems wurde die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür wurden auf einer HPTLC-Platte jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen aufgetragen. Die Berechnung der Varianzen erfolgt mit der Formel 1 (Seite166).

Tabelle 23: Varianzhomogenität Berberin und Coptisin

Lösung	Berberin		Lösung	Coptisin	
	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$		Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$
1	5159,0	21066,8	1	9655,4	54435,3
2	5330,3	21750,4	2	10058,4	57480,6
3	5451,5	21905,6	3	10501,8	57743,5
4	5302,9	21156,5	4	10287,9	56231,4
5	6515,9	21389,4	5	13170,8	57596,8
6	3943,6	20605,5	6	7321,4	53738,9
Mittelwert $[\bar{y}]$	5284	21312	Mittelwert $[\bar{y}]$	10166	56204
Varianz $[s^2]$	10144	25070	Varianz $[s^2]$	2920092	2524238
PG	3,46			1,16	
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1 , f_2)	10,97			10,97	

Tabelle 24: Varianzhomogenität Epiberberin und Palmatin

Lösung	Epiberberin		Lösung	Palmatin	
	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$		Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$
1	10181,9	35736,9	1	586,9	5369,4
2	10613,4	37270,5	2	611,4	5460,9
3	10910,4	37687,9	3	675,1	5493,3
4	10690,1	36237,0	4	613,3	5152,4
5	13548,0	37235,6	5	805,5	5381,1
6	7801,7	35561,9	6	470,5	5017,2
Mittelwert $[\bar{y}]$	10624	36622	Mittelwert $[\bar{y}]$	627	5312
Varianz $[s^2]$	2799519	664773	Varianzen $[s^2]$	10144	29248
PG	4,21			2,88	
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1 , f_2)	10,97			10,97	

Die aus den Untersuchungen (Tabellen 23 und 24) gewonnenen Prüfgrößen (PG) sind kleiner als der tabellierte Wert in der *F-Wert* Tabelle (P=99%, f_1 , f_2). Es wurde somit von einem gültigen Kalibriersystem im Messbereich ausgegangen.

3.2.5.1.4 Wiederholpräzision

Auf Grundlage der Ergebnisse der Kalibrierungsuntersuchungen (3.2.5.1.3) wurden drei Untersuchungslösungen von jeder Drogenprobe hergestellt. Auf drei 200x100 mm Platten wurden jeweils eine Untersuchungslösung (7 Proben) und die verschiedenen Konzentrationen der Kalibrierstandards aufgetragen. Zur Berechnung der Wiederholpräzision (Tab. 25) wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) bestimmt (Tab. 26).

Tabelle 25: Ergebniszusammenfassung Wiederholpräzision 1-3 (Coptis)

WP1 Coptis_080710_01_01	Fläche						
	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	14500	14208	14604	15848	16663	9021	17978
Coptisin	42530	42074	45014	47702	51023	22955	28436
Epiberberin	20455	19816	20491	21309	26179	1892	n.v.
Palmatin	3519	3331	3433	3702	3249	1039	1785
Gehalt [%]							
Berberin	7,94	7,98	8,07	9,11	9,62	4,56	10,12
Coptisin	1,93	1,96	2,05	2,23	2,38	1,08	1,31
Epiberberin	1,58	1,57	1,60	1,71	2,12	0,07	0
Palmatin	1,54	1,49	1,51	1,68	1,47	0,41	0,75
WP2 Coptis_080710_01_02	Fläche						
	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	15360	14751	16119	16677	17795	9499	18710
Coptisin	43526	41969	46068	48231	52614	23316	28692
Epiberberin	21388	20151	21568	21535	27346	1908	n.v.
Palmatin	3545	3413	3682	3854	3453	1242	1765
Gehalt [%]							
Berberin	7,81	7,78	8,33	8,82	9,68	4,52	9,98
Coptisin	1,91	1,92	2,04	2,17	2,40	1,09	1,31
Epiberberin	1,54	1,50	1,57	1,59	2,11	0,00	n.v.
Palmatin	1,43	1,43	1,50	1,60	1,45	0,45	0,68
WP3 Coptis_080710_01_03	Fläche						
	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	14460	15201	15357	16902	18323	10895	16986
Coptisin	40288	41835	43315	48752	54024	24894	24367
Epiberberin	18757	19675	19709	20830	27530	2524	n.v.
Palmatin	3184	3435	3325	3738	3456	1884	3049
Gehalt [%]							
Berberin	7,61	7,78	8,16	8,78	9,73	5,30	8,81
Coptisin	1,86	1,87	2,00	2,16	2,41	1,16	1,12
Epiberberin	1,48	1,50	1,56	1,59	2,15	0,15	n.v.
Palmatin	1,37	1,43	1,43	1,57	1,46	0,75	1,26

Tabelle 26: Kalibrierfunktionen der Wiederholpräzision (Coptis Alkaloide)

Substanz	Kalibrierfunktion		
	WP1	WP2	WP3
Berberin	$y = 161,4x + 1765,6$	$y = 167,3x + 2040,5$	$y = 171,2x + 1882,2$
Coptisin	$y = 2293,5x - 1358,6$	$y = 2310,7x - 1433,4$	$y = 2356,7x - 2140,8$
Epiberberin	$y = 1235,2x + 1036,3$	$y = 1239,4x + 1937,9$	$y = 1270,5x + 618,5$
Palmatin	$y = 219,4x + 163,5$	$y = 228,5x + 222,0$	$y = 224,6x + 218,6$

Tabelle 27: Zusammenfassung der Wiederholpräzisionsergebnisse (Coptis)

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, WP1-3=Gehalt in Prozent der Messung 1-3 der Laborpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	WP1[%]	7,94	7,98	8,07	9,11	9,62	4,56	10,12
	WP2[%]	7,81	7,78	8,33	8,82	9,68	4,52	9,98
	WP3[%]	7,61	7,78	8,16	8,78	9,73	5,30	8,81
	MW [%]	7,79	7,85	8,19	8,90	9,68	4,79	9,64
	STABWN[%]	0,14	0,09	0,11	0,15	0,04	0,36	0,59
	V_k [%]	1,74	1,20	1,32	1,65	0,46	7,48	6,09
Coptisin	WP1[%]	1,93	1,96	2,05	2,23	2,38	1,08	1,31
	WP2[%]	1,91	1,92	2,04	2,17	2,40	1,09	1,31
	WP3[%]	1,86	1,87	2,00	2,16	2,41	1,16	1,12
	MW [%]	1,90	1,92	2,03	2,19	2,40	1,11	1,25
	STABWN[%]	0,03	0,04	0,02	0,03	0,01	0,04	0,09
	V_k [%]	1,55	1,92	1,06	1,41	0,52	3,21	7,18
Epiberberin	WP1[%]	1,58	1,57	1,60	1,71	2,12	0,07	n.v.
	WP2[%]	1,54	1,50	1,57	1,59	2,11	0,00	n.v.
	WP3[%]	1,48	1,50	1,56	1,59	2,15	0,15	n.v.
	MW [%]	1,53	1,52	1,58	1,63	2,13	0,07	n.v.
	STABWN[%]	0,04	0,03	0,02	0,06	0,02	0,06	n.v.
	V_k [%]	2,68	2,17	1,08	3,47	0,80	83,57	n.v.
Palmatin	WP1[%]	1,54	1,49	1,51	1,68	1,47	0,41	0,75
	WP2[%]	1,43	1,43	1,50	1,60	1,45	0,45	0,68
	WP3[%]	1,37	1,43	1,43	1,57	1,46	0,75	1,26
	MW [%]	1,45	1,45	1,48	1,62	1,46	0,54	0,90
	STABWN[%]	0,07	0,03	0,04	0,05	0,01	0,15	0,26
	V_k [%]	4,87	1,95	2,40	2,87	0,56	28,27	28,83

Die Auswertung der Wiederholpräzision (Tab. 27) zeigte für die Proben 6 und 7 Ergebnisse über den geforderten 10,0 % des Variationskoeffizienten. Ursächlich dafür könnte der Zerkleinerungsgrad der erhaltenen Drogen sein. Eine weitere Zerkleinerung war nicht möglich, da nur geringe Mengen an Untersuchungsmaterial vorlagen. Die Untersuchungen im Rahmen der Validierung wurden durchgeführt, da die Spezies *Coptis deltoidea* und *Coptis teeta* von kommerziellen Anbietern aus Deutschland und der Schweiz nicht erhältlich waren und die Gehalte an Epiberberin in den Spezies *C. chinensis*, *C. deltoidea* und *C. teeta* stark unterschiedlich waren. In die Bewertung der Laborpräzision wurden nur die Ergebnisse der Untersuchung der Proben CrP1-4 (von kommerziellen Anbietern) einbezogen. Die Untersuchung der Laborpräzision führte dann zu Ergebnissen unter 10,0 %, die akzeptiert wurden. Insgesamt ist dies jedoch problematisch, da die Methode nur dann eine gültige Wiederholpräzision aufweist, wenn *C. deltoidea* und *C. teeta* nicht mit einbezogen würden.

3.2.5.1.5 Laborpräzision

Auf Grundlage der Ergebnisse der Kalibrierungsuntersuchungen (3.2.5.1.3) wurde eine Untersuchungslösung von jeder Drogenprobe hergestellt. Auf eine 200x100 mm Platten wurden jeweils eine Untersuchungslösung (7 Proben) und die Kalibrierstandards aufgetragen. Dies wurde am darauffolgenden Tag wiederholt. In die Untersuchung (Tab. 28) wurde die erste Platte der Wiederholpräzision mit einbezogen, so dass sich eine Gesamtzahl von $n = 3$ ergab. Für die Berechnung der Laborpräzision wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet (Tab. 29).

Tabelle 28: Ergebniszusammenfassung Laborpräzision (Coptis)

LP2 Coptis_080716_01_02	Fläche [mAU]						
	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	14114,01	14075,51	15160,74	16426,48	17661,47	9572,21	19263,59
Coptisin	38102,13	38320,10	42421,65	46226,76	50820,26	22830,95	53353,91
Epiberberin	17695,53	17628,81	18952,40	19487,41	25477,15	1838,40	n.V.0
Palmatin	3011,50	3169,75	3372,59	3722,81	3214,99	1138,16	2324,33
	Gehalt [%]						
	7,22	7,42	8,04	8,71	9,44	4,81	10,14
Berberin	7,22	7,42	8,04	8,71	9,44	4,81	10,14
Coptisin	1,78	1,85	2,03	2,19	2,41	1,14	2,47
Epiberberin	1,47	1,51	1,63	1,66	2,19	0,12	0
Palmatin	1,23	1,34	1,42	1,57	1,35	0,45	0,94
LP3 Coptis_080716_01_03	Fläche [mAU]						
	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	15238,34	14663,04	15074,66	16187,61	17494,24	9607,4	17132,52
Coptisin	39408,38	36798,07	40684	45190,79	51125,47	22614,86	23639,2
Epiberberin	19147,84	17650,83	18670,77	19844,24	26027,87	1859,17	n.v.
Palmatin	3566,2	3439,96	3424,2	3752,58	3465,31	1373,66	2173,02
	Gehalt [%]						
	7,94	7,55	7,92	8,51	9,31	4,74	8,80
Berberin	7,94	7,55	7,92	8,51	9,31	4,74	8,80
Coptisin	1,92	1,79	1,99	2,18	2,45	1,18	1,18
Epiberberin	1,62	1,49	1,60	1,68	2,19	0,23	0
Palmatin	1,42	1,35	1,37	1,50	1,38	0,52	0,82

Tabelle 29: Kalibrierfunktionen der Laborpräzision (Coptis Alkaloide)

Substanz	Kalibrierfunktion		
	WP1/LP1	LP2	LP3
Berberin	$y = 161,42x + 1765,61$	$y = 176,46x + 1217,76$	$y = 175,97x + 1453,74$
Coptisin	$y = 2293,54x - 1358,61$	$y = 2227,82x - 2103,1$	$y = 2288,14x - 3803$
Epiberberin	$y = 1235,22x + 1036,31$	$y = 1153,32x + 512,03$	$y = 1258,26x - 960,92$
Palmatin	$y = 219,37x + 163,5$	$y = 233,26x + 108,15$	$y = 246,24x + 128,14$

Tabelle 30: Präzisionsergebnisse (Coptis)

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, WP1=Gehalt der Wiederholpräzisionsmessung 1 in Prozent, LP1,2 und 3=Gehalt der Laborpräzisionsmessung 1-3 in Prozent, MW% = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	WP1/LP1[%]	7,94	7,98	8,07	9,11	9,62	4,56	10,12
	LP2[%]	7,22	7,42	8,04	8,71	9,44	4,81	10,14
	LP3[%]	7,94	7,55	7,92	8,51	9,31	4,74	8,80
	MW [%]	7,70	7,65	8,01	8,78	9,46	4,70	9,69
	STABWN[%]	0,34	0,24	0,06	0,25	0,13	0,11	0,63
	V_k [%]	4,41	3,13	0,81	2,84	1,34	2,24	6,47
Coptisin	WP1/LP1[%]	1,93	1,96	2,05	2,23	2,38	1,08	1,31
	LP2[%]	1,78	1,85	2,03	2,19	2,41	1,14	2,47
	LP3[%]	1,92	1,79	1,99	2,18	2,45	1,18	1,18
	MW [%]	1,88	1,87	2,02	2,20	2,41	1,13	1,65
	STABWN[%]	0,07	0,07	0,02	0,02	0,03	0,04	0,58
	V_k [%]	3,65	3,77	1,23	0,98	1,19	3,63	35,07
Epiberberin	WP1/LP1[%]	1,58	1,57	1,60	1,71	2,12	0,07	n.V.
	LP2[%]	1,47	1,51	1,63	1,66	2,19	0,12	n.V.
	LP3[%]	1,62	1,49	1,60	1,68	2,19	0,23	n.V.
	MW [%]	1,56	1,52	1,61	1,68	2,17	0,14	n.V.
	STABWN[%]	0,06	0,03	0,01	0,02	0,03	0,07	n.V.
	V_k [%]	4,07	2,23	0,88	1,22	1,52	47,74	n.V.
Palmatin	WP1/LP1[%]	1,54	1,49	1,51	1,68	1,47	0,41	0,75
	LP2[%]	1,23	1,34	1,42	1,57	1,35	0,45	0,94
	LP3[%]	1,42	1,35	1,37	1,50	1,38	0,52	0,82
	MW [%]	1,40	1,39	1,43	1,58	1,40	0,46	0,84
	STABWN[%]	0,13	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05	0,08
	V_k [%]	9,14	4,91	4,04	4,68	3,64	9,88	9,38

Die Ergebnisse (Tab. 30) zeigten vergleichbare Schwankungen wie bei den Untersuchungen zur Wiederholpräzision (3.2.5.1.4) und wurden unter den gleichen Bedingungen akzeptiert. Die Untersuchung der Laborpräzision führte zu Variationskoeffizienten unter 10,0 %, so dass die Laborpräzision akzeptiert werden konnte.

3.2.5.1.6 Lineare Regression

Für die Berechnung der linearen Regression (Tab. 31) wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet. Die Berechnungsgrundlage für die lineare Regression der einzelnen Substanzen ist der Mittelwert der Kalibrierungen aller Präzisionsmessungen.

Tabelle 31: Kalibrierfunktionen (lineare Regression) für die Coptis Alkaloide

Substanz	Kalibrierfunktion
Berberin	$y = 170,5x + 1672,0$
Coptisin	$y = 2295x - 2127,2$
Epiberberin	$y = 123,3x + 494,5$
Palmatin	$y = 230,4x + 163,6$

3.2.5.1.6.1 Korrelationskoeffizient (r)

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten (Tab. 32) erfolgt mit der Formel 30 (Seite 173).

Tabelle 32: Korrelationskoeffizient Coptis Alkaloide

	Korrelationskoeffizienten für die Kalibrierfunktion
Berberin	0,996
Coptisin	0,999
Epiberberin	0,993
Palmatin	0,998

3.2.5.1.6.2 Reststandardabweichung (s_y)

Die Berechnung der Reststandardabweichung (Tab. 33) erfolgte mit der Formel 13 (Seite 170).

Tabelle 33: Reststandardabweichung Coptis Alkaloide

	Reststandardabweichung (s_y)
Berberin	475,47
Coptisin	556,19
Epiberberin	79,46
Palmatin	881,87

3.2.5.1.6.3 Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung (Tab. 34) erfolgte mit der Formel 14 (Seite 170).

Tabelle 34: Verfahrensstandardabweichung Coptis Alkaloide

	Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})
Berberin	2,79%
Coptisin	0,24%
Epiberberin	0,34%
Palmatin	0,72%

3.2.5.1.6.4 relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der rel. Verfahrensstandardabweichung erfolgt mit Formel 15 (Seite 166).

Tabelle 35: rel. Verfahrensstandardabweichung Coptis Alkaloide

	Rel. Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})
Berberin	3,90%
Coptisin	1,62%
Epiberberin	2,62%
Palmatin	4,06%

3.2.5.1.7 Quadratische Regression

Die Berechnung der quadratischen Regression (Tab. 36) erfolgte mit der Formel 16 (Seite 171) bis Formel 24 (Seite 172). Die Berechnungsgrundlage für die quadratische Regression der einzelnen Substanzen war der Mittelwert der Kalibrierungen aller Präzisionsmessungen.

Tabelle 36: Quadratische Regression Coptis Alkaloide

	Quadratische Regression
Berberin	$y = -0,32x^2 + 217,1x + 331,3$
Coptisin	$y = 2,62x^2 + 2216,7 - 1676,8$
Epiberberin	$y = 2,47x^2 + 1143,5 + 1215,0$
Palmatin	$y = -0,83x^2 + 252,2x + 71,3$

3.2.5.1.7.1 Reststandardabweichung (s_y)

Die Berechnung der Reststandardabweichung (Tab. 37) erfolgte mit der Formel 25 (Seite 172).

Tabelle 37: Reststandardabweichung quadratische Regression Coptis Alkaloide

	Reststandardabweichung (s_y)
Berberin	227,4
Coptisin	624,6
Epiberberin	73,5
Palmatin	1008,0

3.2.5.1.7.2 Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung (Tab. 38) erfolgte mit der Formel 26 (Seite 172).

Tabelle 38: Verfahrensstandardabweichung quadratische Regression Coptis Alkaloide

	Reststandardabweichung (s_{y0})
Berberin	1,33%
Coptisin	0,27%
Epiberberin	0,32%
Palmatin	0,82%

3.2.5.1.7.3 relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der rel. Verfahrensstandardabweichung (Tab. 39) erfolgte mit der Formel 28 (Seite 172).

Tabelle 39: rel. Verfahrensstandardabweichung quadratische Regression Coptis Alkaloide

	Rel. Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})
Berberin	1,86%
Coptisin	1,82%
Epiberberin	4,64%
Palmatin	2,42%

3.2.5.1.7.4 Überprüfung der Varianzen von quadratischer und linearer Regression

Für die Überprüfung wurden die Reststandardabweichungen der linearen und quadratischen Regression miteinander verglichen. Die Prüfgröße wurde mit Formel 29 (Seite 173) berechnet. Die berechnete Prüfgröße (PG, Tab. 40) wurde mit dem Wert aus der F-Tabelle mit F (P=99%, f1, f2) verglichen.

Tabelle 40: Prüfgrößen Coptis Alkaloide

	Prüfgröße
Berberin	0,2
Coptisin	1,3
Epiberberin	0,9
Palmatin	1,3
F (P=99%, f1, f2)	98,50

Die Prüfgröße ist kleiner als der tabellierte Wert in der F-Tabelle: die Überprüfung konnte akzeptiert werden. Es kann für die Berechnung der Gehalte mit 99%-iger Sicherheit von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden.

3.2.5.1.7.5 Prognoseintervall und Probeauswertung

Für die Berechnung der Gehalte wurden die gemittelten Kalibrierfunktionen (3.2.5.1.6) der Präzisionsmessungen verwendet (Tab. 41). Die Berechnungsgrundlage für die Berechnung der Gehalte der einzelnen Substanzen war der Mittelwert der Kalibrierungen aller Präzisionsmessungen.

Tabelle 41: Probenauswertung (Coptis)

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, WP1-3=Gehalt der Wiederholpräzisionsmessung 1-3 in Prozent, LP2 und 3=Gehalt der Laborpräzisionsmessung 2 und 3 in Prozent, MW=Mittelwert des Gehaltes, STABWN=Standardabweichung berechnet nach der Exceelfunktion STABWN, V_k =Variationskoeffizient nach Formel 3, n.v.=nicht vorhanden

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	WP1/LP1[%]	7,94	7,98	8,07	9,11	9,62	4,56	10,12
	WP2[%]	7,81	7,78	8,33	8,82	9,68	4,52	9,98
	WP3[%]	7,61	7,78	8,16	8,78	9,73	5,3	8,81
	LP2[%]	7,22	7,42	8,04	8,71	9,44	4,81	10,14
	LP3[%]	7,94	7,55	7,92	8,51	9,31	4,74	8,8
	MW [%]	7,7	7,7	8,1	8,79	9,56	4,79	9,57
	STABWN[%]	0,27	0,2	0,14	0,19	0,16	0,28	0,63
	V_k [%]	3,51	2,54	1,69	2,21	1,65	5,83	6,55
Coptisin	WP1/LP1[%]	1,93	1,96	2,05	2,23	2,38	1,08	1,31
	WP2[%]	1,91	1,92	2,04	2,17	2,4	1,09	1,31
	WP3[%]	1,86	1,87	2	2,16	2,41	1,16	1,12
	LP2[%]	1,78	1,85	2,03	2,19	2,41	1,14	2,47
	LP3[%]	1,92	1,79	1,99	2,18	2,45	1,18	1,18
	MW [%]	1,88	1,88	2,02	2,19	2,41	1,13	1,48
	STABWN[%]	0,06	0,06	0,02	0,02	0,02	0,04	0,5
	V_k [%]	2,95	3,11	1,14	1,11	0,95	3,45	33,93
Epiberberin	WP1/LP1[%]	1,58	1,57	1,6	1,71	2,12	0,07	n.v.
	WP2[%]	1,54	1,50	1,57	1,59	2,11	0,00	n.v.
	WP3[%]	1,48	1,50	1,56	1,59	2,15	0,15	n.v.
	LP2[%]	1,47	1,51	1,63	1,66	2,19	0,12	n.v.
	LP3[%]	1,62	1,49	1,6	1,68	2,19	0,23	n.v.
	MW [%]	1,54	1,51	1,59	1,65	2,15	0,11	n.v.
	STABWN[%]	0,06	0,03	0,02	0,05	0,03	0,08	n.v.
	V_k [%]	3,73	1,9	1,56	2,94	1,57	67,63	n.v.
Palmatin	WP1/LP1[%]	1,54	1,49	1,51	1,68	1,47	0,41	0,75
	WP2[%]	1,43	1,43	1,5	1,6	1,45	0,45	0,68
	WP3[%]	1,37	1,43	1,43	1,57	1,46	0,75	1,26
	LP2[%]	1,23	1,34	1,42	1,57	1,35	0,45	0,94
	LP3[%]	1,42	1,35	1,37	1,5	1,38	0,52	0,82
	MW [%]	1,4	1,41	1,45	1,58	1,42	0,52	0,89
	STABWN[%]	0,1	0,06	0,05	0,06	0,05	0,12	0,2
	V_k [%]	7,2	3,98	3,62	3,67	3,37	23,69	22,92

Berechnungsgrundlage für die Berechnung des Prognoseintervalls (Tab. 42) waren alle Kalibrierungen und Probenmessungen über alle Platten der Präzisionsmessungen. Die Berechnung des Prognoseintervalls erfolgt mit Formel 32 (Seite 174).

Tabelle 42: Prognoseintervall Coptis

Gehalt [%]	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	7,70±0,41	7,70±0,41	8,10±0,41	8,79±0,43	9,56±0,45	4,79±0,45	9,57±0,45
Coptisin	1,88±0,04	1,88±0,04	2,02±0,05	2,19±0,05	2,41±0,05	1,13±0,04	1,48±0,04
Epiberberin	1,55±0,12	1,53±0,12	1,60±0,12	1,66±0,12	2,16±0,13	0,12±0,22	n.V.
Palmatin	1,39±0,06	1,42±0,06	1,47±0,06	1,60±0,06	1,44±0,06	0,53±0,07	0,89±0,06

3.2.5.1.8 Robustheit

Für die Untersuchung der Robustheit wurde die Laufstrecke variiert. Ausgehend von einer Laufstrecke von 60 mm für die Präzisionsuntersuchungen wurde die Laufstrecke um 5 mm erhöht beziehungsweise um 5 mm verkürzt. Für die Bewertung der Robustheit wurde der Variationskoeffizient aus den Messungen der Laborpräzision 1 und den Messungen der Robustheit aus den Gehalten der Substanzen Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin berechnet. Das Akzeptanzkriterium wurde mit einem Variationskoeffizient von $\leq 15\%$ festgelegt.

Tabelle 43: Robustheitsprüfung

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, RP1,2=Gehalt der Robustheitsmessung 1,2 in Prozent, LP1=Gehalt der Laborpräzisionsmessung 1 in Prozent, MW=Mittelwert des Gehaltes, STABWN=Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k =Variationskoeffizient nach Formel 1, n.v.=nicht vorhanden

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	LP1[%]	7,94	7,98	8,07	9,11	9,62	4,56	10,12
	RP1[%]	8,07	8,11	8,41	9,34	10,69	5,29	10,57
	RP2[%]	8,44	8,01	8,07	9,19	9,56	4,58	8,72
	MW [%]	8,15	8,03	8,18	9,21	9,96	4,81	9,80
	STABWN[%]	0,18	0,05	0,14	0,08	0,45	0,29	0,68
	V_k [%]	2,25	0,60	1,70	0,90	4,52	6,11	6,96
Coptisin	LP1[%]	1,93	1,96	2,05	2,23	2,38	1,08	1,31
	RP1[%]	1,63	1,81	1,95	2,14	2,37	1,01	1,24
	RP2[%]	2,11	1,99	2,11	2,37	2,52	1,12	1,51
	MW [%]	1,89	1,92	2,04	2,25	2,42	1,07	1,35
	STABWN[%]	0,17	0,07	0,06	0,08	0,06	0,04	0,10
	V_k [%]	9,07	3,55	2,81	3,65	2,45	3,68	7,32
Epiberberin	LP1[%]	1,58	1,57	1,6	1,71	2,12	0,07	n.v.
	RP1[%]	1,34	1,48	1,48	1,55	2,12	0	n.v.
	RP2[%]	1,61	1,74	1,76	1,9	2,37	0,05	n.v.
	MW [%]	1,51	1,60	1,61	1,72	2,20	0,04	n.v.
	STABWN[%]	0,10	0,09	0,10	0,12	0,10	0,03	n.v.
	V_k [%]	6,93	5,85	6,16	7,20	4,63	63,74	n.v.
Palmatin	LP1[%]	1,54	1,49	1,51	1,68	1,47	0,41	0,75
	RP1[%]	1,79	1,73	1,59	1,81	2,05	0,99	1,44
	RP2[%]	1,61	1,45	1,44	1,67	1,43	0,43	0,6
	MW [%]	1,65	1,56	1,51	1,72	1,65	0,61	0,93
	STABWN[%]	0,09	0,11	0,05	0,06	0,25	0,23	0,32
	V_k [%]	5,54	6,88	3,51	3,21	14,87	38,17	34,06

Die Auswertung der Robustheit zeigte wie schon bei den Untersuchungen zur Präzision bei den Proben 5, 6 und 7 höhere Werte für den Variationskoeffizienten. Die Untersuchung wurde unter den gleichen Bedingungen akzeptiert. Die Untersuchung der Robustheit führte zu Ergebnissen unter 15,0 % und der Test kann akzeptiert werden.

3.2.5.1.9 Wiederfindungsrate

Zu ca. 10 mg einer genau eingewogenen Menge pulverisierte Droge von *Coptidis rhizoma* wurde eine bekannte Menge (0,0176 mg) von Coptisin (in Lösung) zugegeben und diese Mischung mit 10 ml einer 100:1 Mischung Methanol:Salzsäure extrahiert. Zusätzlich wurde eine Drogenprobe ohne Zusatz von Coptisin extrahiert. Auf eine Platte wurde dreimal der Extrakt unter Zusatz von Coptisin und dreimal ohne Zusatz von Coptisin aufgetragen. Zusätzlich wurde jeweils zweimal Level 5 und Level 6 der Kalibrierlösung von Coptisin mit aufgetragen, um die Gehalte zu berechnen. Für die Berechnung wurde eine Kalibriergerade (Tab. 44) aufgestellt. Die Wiederfindung berechnet sich nach Formel 34 (Seite 175).

Tabelle 44: Ergebnis der Wiederfindungsuntersuchung

Platten ID: 080722_01_02

	Fläche [mAU] Probe	Fläche [mAU] Aufstockung	Fläche [mAU] Level 5	Fläche [mAU] Level 6
1. Messung	30047	34830,61	32793	42028
2. Messung	31821	35410,35	33847	39397
3. Messung	32169	35479,89	-	-
MW	31346	35240	33320	40713
Gehalt	1,947 %	2,14 %	-	-
Gehalt berechnet	-	1,947%+0,176% =2,123%	-	-
Wiederfindung	-	100,67%	-	-

Die Wiederfindungsrate von Coptisin zu einer Pflanzenprobe von *Coptis chinensis* liegt bei 100,67 % (Tab. 44).

3.2.5.1.9.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen der vier Alkaloide (Tab. 45) wurden nach Formel 15 (Seite 170) berechnet.

Tabelle 45 Nachweisgrenzen Coptis Alkaloide

	Nachweisgrenze [µg/ml]
Berberin	7,97
Coptisin	0,80
Epiberberin	1,14
Palmatin	2,36

3.2.5.1.10 Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenzen der vier Alkaloide (Tab. 46) wurden nach Formel 16 (Seite 171) berechnet.

Tabelle 46: Quantifizierungsgrenzen Coptis Alkaloide

	Quantifizierungsgrenze [μg]
Berberin	24,15
Coptisin	2,42
Epiberberin	3,45
Palmatin	7,15

3.2.5.2 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Die Methode der Wahl bei nicht flüchtigen Inhaltsstoffen stellt im Laboralltag die HPLC dar, weshalb für die Untersuchungen im Rahmen der Erstellung des Monographievorschlags verschiedene Methoden überprüft wurden. Die Verwendung eines Ionenpaarbildners nach [Wagner (2004)] hat sich in den vorliegenden Untersuchungen als nachteilig für die Reproduzierbarkeit der Methode herausgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt), so dass Methoden mit Ionenpaarreagenzien in der Folge nicht weiter untersucht wurden. Auch andere publizierte Methoden führten nicht zum gewünschten Erfolg [Chuang (1996)], [Lingling Ren (2007)] (Ergebnisse nicht dargestellt), so dass eine neue Methode entwickelt wurde. Für die Validierung der Methode erwies sich ein endcapptes RP 18 Säulenmaterial als vorteilhaft. Hier waren die Retentionszeiten im Vergleich zu älteren, nicht endcappten Materialien zwar deutlich höher, die Reproduzierbarkeit der Methode war aber deutlich besser.

Es wurden in einem 100 ml Messkolben 100,0 mg pulverisierte Droge mit einer Mischung von Methanol R und Salzsäure R (100:1) versetzt und in einem Ultraschallbad 15 Minuten extrahiert. Ein aliquoter Teil wurde durch einen 0,45- μm -Spritzenfilter filtriert, das Filtrat diente als Untersuchungslösung. 10 μl der Untersuchungslösung wurden in eine HPLC-Anlage mit DAD eingespritzt, als Trennsäule wird RP-Material [Purosphäre STAR RP-18e (5 μm), Hibar® RT 250-4] mit Vorsäule [Purosphäre STAR RP-18e (5 μm), Hibar® RT 4-4] verwendet. Die Säulentemperatur lag bei 25°C, als Fließmittel diente A: Wasser mit 0,5% ortho-Phosphorsäure 85%; B: Acetonitril mit 0,5% ortho-Phosphorsäure (85%); in der Zusammensetzung: B 0 - 10 Minuten: 20%; 10 - 20 Minuten: 20% - 21%; 20 - 35 Minuten: 21% - 35%; 35 - 36 Minuten: 35%; 36 - 37 Minuten: 35% - 20%; 37 - 47 Minuten: 20%; mit einer Flußrate von 0,7 ml/min und einer Detektionswellenlänge von 344 nm.

3.2.5.2.1 Stabilität der Analyten in Lösung

Die Lösung einer authentischen Drogenprobe wurde wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben chromatographiert. Die Probe wurde wiederholt in das System eingespritzt und die Chromatogramme der einzelnen Läufe ausgewertet (Tab. 47), der Variationskoeffizient der Peakflächen von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin durften nicht mehr als 6% betragen. Die Probe ist mindestens 3 Stunden in Lösung stabil, wenn die Variationskoeffizienten der Peakflächen von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin des Extrakts nicht größer als 6% sind.

Tabelle 47: Stabilität der Analyten in Lösung (Extrakt)

MW = Mittelwert der Messung 1 – Messung 30, STABWN = Excelfunktion für die Standardabweichung, V_k = Variationskoeffizient (Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert), Analysenzeit je Messung 47 Minuten

Messung	Berberin [mAU]	Coptisin [mAU]	Epiberberin [mAU]	Palmatin [mAU]
1	14854372	4550853	2293612	3858088
2	14988491	4603139	2322875	3896676
3	14953867	4596734	2330895	3897795
4	15010225	4588805	2344392	3901853
5	14979840	4586684	2340530	3897446
6	14928228	4580606	2345179	3893068
7	14883636	4570125	2343916	3881669
8	14971972	4590858	2360175	3896769
9	14924205	4579933	2359369	3898497
10	15154950	4651030	2393278	3954558
11	14937085	4563203	2358829	3882830
12	14967567	4588476	2372486	3898498
13	14898502	4565634	2364556	3881570
14	14919562	4569737	2374221	3893694
15	14936235	4579047	2372914	3891593
16	14908341	4561440	2374338	3883344
17	14881347	4554278	2373233	3877789
18	14920387	4567610	2386901	3877287
19	14919744	4560945	2388333	3881494
20	14903683	4556942	2386372	3878856
21	14908548	4549539	2387911	3874251
22	14877699	4551498	2394219	3868542
23	14843717	4539464	2388526	3862444
24	15075744	4605763	2428982	3928363
25	15044352	4599301	2427241	3915158
26	14855137	4537605	2401035	3860504
27	14854638	4529826	2391717	3866385
28	14940103	4549924	2407733	3883761
29	14990751	4561254	2425806	3898667
30	14976347	4574272	2419463	3886538
MW	14940309	4572151	2375301	3888933
STABWN	67947	24457	31541	19612
V_k	0,45	0,53	1,33	0,50
[Messung 30]/ [Messung 1]*100 %	100,8	100,5	105,5	100,7

Die Analysenzeit je Messung betrug 47 Minuten. Der Variationskoeffizient (V_k) lag bei wiederholter Messung der gleichen Probe über einen Zeitraum von 23,5 Stunden unter den geforderten 6%. Der Test für die Stabilität der Analyten in Lösung konnte akzeptiert werden.

3.2.5.2.2 Spezifität

Die Methode für die Quantifizierung von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin in *Coptidis rhizoma* ist spezifisch, wenn die Peaks der Substanzen Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin in den Chromatogrammen vorhanden sind. Für die Spezies *Coptis teeta* ist bekannt, dass sie kein Epiberberin enthält. Die Substanzpeaks von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin waren in den untersuchten Proben (Musterbeispiel in Abb. 51) vorhanden.

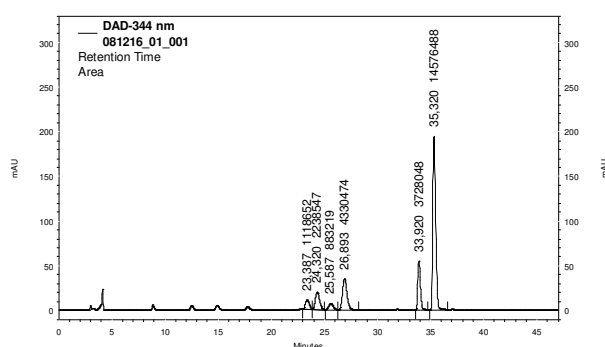


Abb. 51: Spezifität der Methode

Peakzuordnung: 24,3 min: Epiberberin, 26,9 min: Coptisin, 33,9 min: Palmatin, 35,3 min: Berberin

Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.2.5.2.3 Kalibrierung

3.2.5.2.3.1 Messbereich (Range)

Zur Quantifizierung von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin in den Proben von *Coptis chinensis*, *C. deltoidea* und *C. teeta* unbekannten Gehalts musste zunächst der Messbereich festgelegt werden.

Die vorliegenden Drogenproben wurden wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben extrahiert und chromatographiert (Tab. 48). Es wurden Verdünnungen der Referenzsubstanz hergestellt und ebenso chromatographiert (Tab. 49 und Abb. 49). Dabei wurde angenommen, dass sich das Detektorsignal und die aufgetragenen Proben-/ Referenzmengen proportional verhalten.

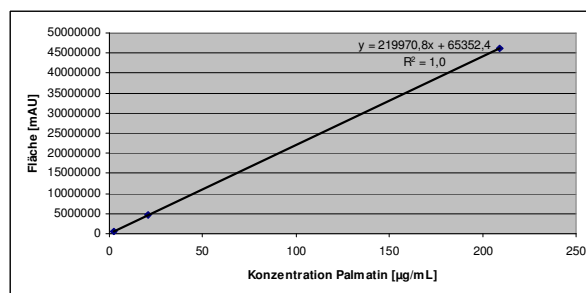
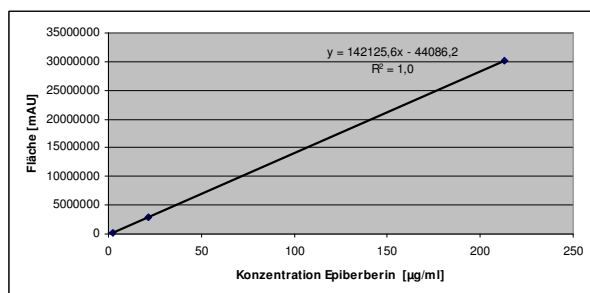
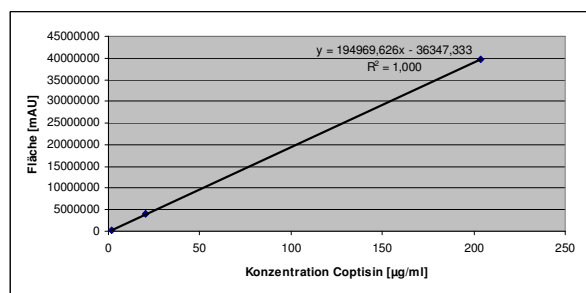
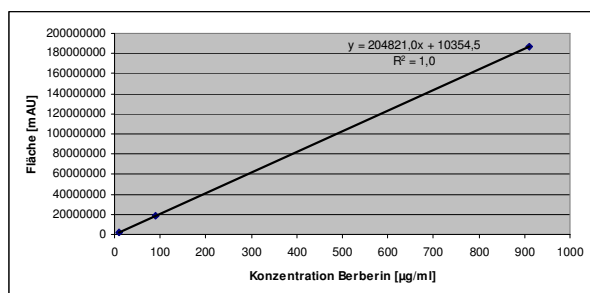
Tabelle 48: Vorversuch Untersuchungslösungen (Coptis HPLC)

CrP1-7 = Coptidis rhizoma Probe 1-7, n.v. = nicht vorhanden

	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Substanz	Fläche[mAU]						
Berberin	14576488	14422779	14595743	16359965	16816155	7670663	17205650
Coptisin	4330474	4202756	4238278	4729431	4934326	2008922	2078641
Epiberberin	2238547	2246024	2233175	2327975	2819942	169631	n.v.
Palmatin	3728048	3782814	3686765	4201936	3289729	1054090	1449902

Tabelle 49: Vorversuch Kalibrierung (Coptis HPLC)

Konz. [µg/ml]	Berberin [mAU]	Konz. [µg/ml]	Coptisin [mAU]	Konz. [µg/ml]	Epiberberin [mAU]	Konz. [µg/ml]	Palmatin [mAU]
910	186395397	204	39736121	213	30227776	209	46033070
91	18672192	20,4	3955721	21,3	2992885	20,9	4730776
9,1	1853205	2,04	348038	2,13	249826	2,09	463243

**Abb. 52: Vorversuch der Kalibrierung für die HPLC von Coptis**

Der Mittelwert der Detektorsignale der Substanzen Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin in den unbekannten Proben wurde als „Mitte“ des Messbereichs festgelegt (Tab. 50). Der Messbereich wurde als: „Mitte“ \pm 50 % festgelegt. Es wurden entsprechend 6 verschiedene (äquidistante) Konzentrationen der Kalibrierlösung hergestellt (Tab. 51).

Tabelle 50: Festlegung des Messbereichs

Mitte = Mittelwert der Probelösungen aus den Vorversuchen, 50% = Mittelwert – 50% Mittelwert, 150% = Mittelwert + 50% Mittelwert, Untere Grenze = angestrebter Signalwert der niedrigsten Kalibrierkonzentration in mAU und Angabe der benötigten Konzentration

		Mitte	50%	150%	Untere Grenze	Obere Grenze
Berberin	mAU	14521063	7260532	21781595	6500000 ≈31,68 µg/ml	24000000 ≈117,12 µg/ml
Coptisin	mAU	3788975	1894488	5683463	1000000 ≈5,32 µg/ml	6000000 ≈30,96 µg/ml
Epiberberin	mAU	1977611	988805	2966416	1250000 ≈9,11 µg/ml	3750000 ≈26,70 µg/ml
Palmatin	mAU	3027612	1513806	4541418	500000 ≈1,98 µg/ml	5000000 ≈22,43 µg/ml

Tabelle 51: Konzentrationen der HPLC Kalibrierlösungen der Coptis Alkaloide

	Konzentrationslevel					
	1	2	3	4	5	6
Substanz	[µg/ml]					
Berberin	32,0	49,0	66,0	83,0	100,0	117,0
Coptisin	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
Epiberberin	9,0	12,6	16,2	19,8	23,4	27,0
Palmatin	2,0	5,6	9,2	12,8	16,4	20,9

Die Probe 6 (CrP6) wurde nicht in die Berechnungen für die Kalibrierung mit Epiberberin einbezogen, da die geschätzte Konzentration des Epiberberins nur etwa 10 % der anderen Proben betrug. Wie sich aus den Untersuchungen durch die Dünnschichtchromatographie gezeigt hatte, lagen die Präzisionsdaten bedingt durch den Zerkleinerungsgrad der Probe 6 in einem Bereich außerhalb der Akzeptanzkriterien. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb auf eine Anpassung des Messbereichs auf die Probe 6 verzichtet.

3.2.5.2.3.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des in Kapitel 3.2.5.2.3 entwickelten Kalibriersystems, wurde die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür wurden jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen wie oben (Kapitel 3.2.5.2) beschrieben chromatographiert (Tabellen 52 und 53). Die Berechnung der Varianzen erfolgte mit Formel 1 (Seite 166).

Tabelle 52: Varianzhomogenität Berberin und Coptisin

Berberin Messung:	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$	Coptisin Messung:	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$
1	1279101	3806726	1	946823	5938160
2	1258662	3838082	2	946823	5937325
3	1271662	3763499	3	920440	6009543
4	1104197	3776766	4	915774	5959386
5	891908	3775618	5	934812	5955893
6	1218172	3750706	6	928074	5970510
Mittelwert \bar{y}	1170617	3785233	Mittelwert \bar{y}	932124	5961803
Varianz $[s^2]$	19013765569	847264108	Varianz $[s^2]$	143264567	592308895
PG	4,30		4,13		
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1, f_2)	10,97		10,97		

Tabelle 53: Varianzhomogenität Epiberberin und Palmatin

Epiberberin Messung:	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$	Messung:	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$
1	1279101	3806726	1	415515	4799584
2	1258662	3838082	2	403086	4932178
3	1271662	3763499	3	391118	4914114
4	1104197	3776766	4	399715	4891677
5	1279101	3775618	5	426438	4836394
6	1218172	3750706	6	431668	4911392
Mittelwert \bar{y}	1235149	3785233	Mittelwert \bar{y}	411257	4880890
Varianz $[s^2]$	3864376963	847264108	Varianz $[s^2]$	211794095	2228597357
PG	4,56		10,52		
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1, f_2)	10,97		10,97		

Die Prüfgröße wurde dann mit Formel 2 (Seite 167) berechnet. Der Wert aus der F-Tabelle ist mit F (P=99%, f_1, f_2) zu entnehmen und mit der Prüfgröße PG zu vergleichen. Es ergab sich für die Prüfgröße PG ein Wert kleiner als der F-Wert, d. h. der Varianzunterschied ist nicht signifikant und die Varianzen sind homogen. Der Arbeitsbereich musste nicht angepasst werden und der Test konnte akzeptiert werden.

3.2.5.2.3.3 Kalibrierfunktion

Aus den Experimenten in Kapitel 3.2.5.2.3.1 wurden die Konzentrationen für die 6 Konzentrationen der Kalibrierfunktion berechnet und aus einer Stammlösung die Verdünnungen für die Lösungen der Kalibriergeradefunktion hergestellt. Die einzelnen Konzentrationen wurden jeweils dreimal wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben chromatographiert (Tabellen 54-57).

Tabelle 54: Kalibrierwertetabelle Berberin (HPLC)

Berberin Level	1	2	3	4	5	6
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	32,0	49,0	66,0	83,0	100,0	117,0
Messung 1 [mAU]	7650727	11036527	14695831	18276496	22163584	24844451
Messung 2 [mAU]	7782945	11070719	14679564	18346353	22189351	24806400
Messung 3 [mAU]	7905851	11053603	14738549	18349104	22217758	24807044
MW	7779841	11053616	14704648	18323984	22190231	24819298
STABWN	104177	13959	24875	33598	22125	17788
V_k	1,34	0,13	0,17	0,18	0,10	0,07

Tabelle 55: Kalibrierwertetabelle Coptisin (HPLC)

Coptisin Level	1	2	3	4	5	6
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
Messung 1	961556	1998863	2948612	4033434	5207391	5975214
Messung 2	965004	1992071	2971070	4016402	5142545	5975112
Messung 3	958100	1981458	2945432	4013721	5193493	5988544
MW	961553	1990797	2955038	4021186	5181143	5979623
STABWN	2819	7162	11410	8730	27876	6308
V_k	0,29	0,36	0,39	0,22	0,54	0,11

Tabelle 56: Kalibrierwertetabelle Epiberberin (HPLC)

Epiberberin Level	1	2	3	4	5	6
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	9,0	12,6	16,2	19,8	23,4	27,0
Messung 1	1292029	1857486	2345051	2635238	3129991	3885741
Messung 2	1276439	1840054	2345086	2576436	3173571	3846806
Messung 3	1278883	1809418	2402038	2692732	3270088	3935750
MW	1282450	1835653	2364058	2634802	3191217	3889432
STABWN	6846	19869	26856	47479	58540	36405
V_k	0,53	1,08	1,14	1,80	1,83	0,94

Tabelle 57: Kalibrierwertetabelle Palmatin (HPLC)

Palmatin Level	1	2	3	4	5	6
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	2,0	5,6	9,2	12,8	16,4	20,9
Messung 1	392621	1252953	2070356	2791942	3720927	4738065
Messung 2	404105	1272530	2146782	2937182	3875765	4788647
Messung 3	415515	1288550	2215435	2982553	3916313	4808774
MW	404080	1271344	2144191	2903892	3837668	4778495
STABWN	9346	14557	59257	81299	84192	29746
V_k	2,31	1,14	2,76	2,80	2,19	0,62

3.2.5.2.3.3.1 Kalibriergerade

Für die Berechnung der Kalibriergeraden (Abb. 50) wurden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wurde eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Diese Gerade wird durch Formel 4

(Seite 168) beschrieben. Für die Berechnung der Kalibriergerade wurden die Parameter m und b mit der Formel 5 (Seite 166) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet.

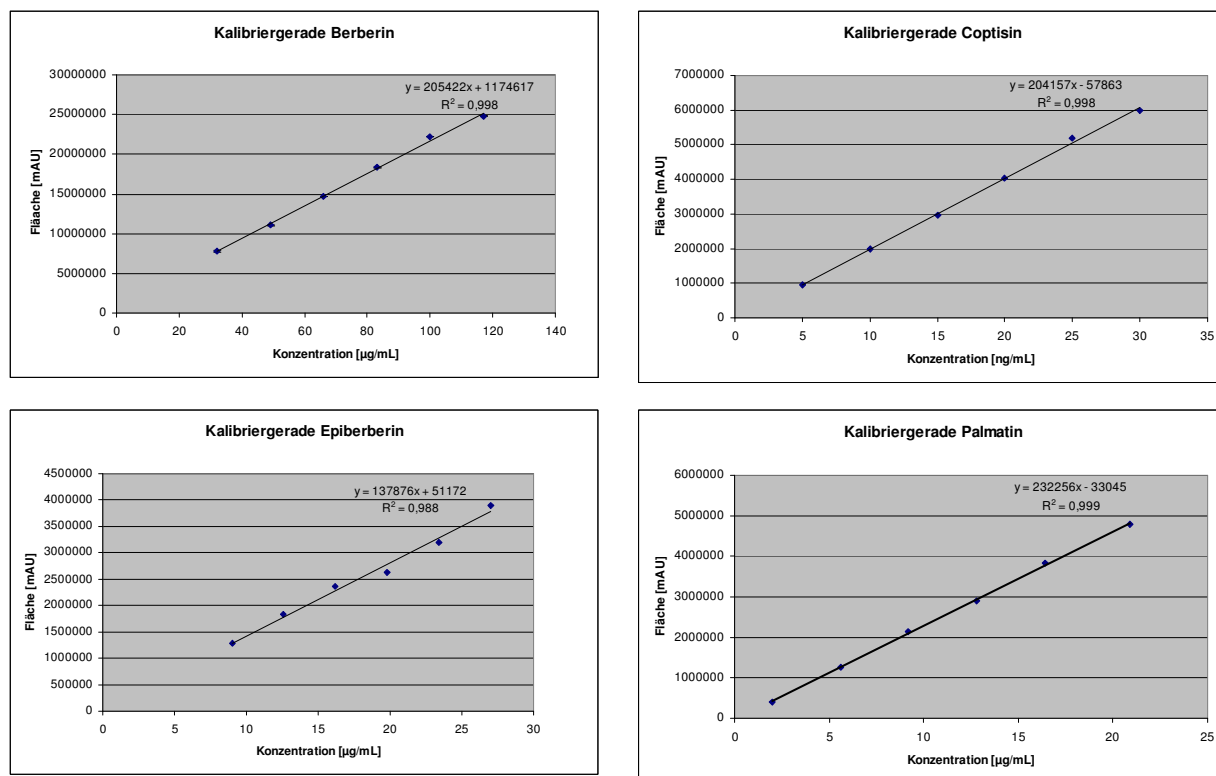


Abb. 53: Kalibriergeraden von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin

3.2.5.2.3.3.2 Reststandardabweichung (s_y)

Die Präzision der Kalibriergeraden wird mit der Reststandardabweichung s_y ausgedrückt (Tab. 58). Die Berechnung erfolgte mit Formel 13 (Seite 170).

Tabelle 58: Reststandardabweichung (Coptis-Alkaloide, HPLC)

	Reststandardabweichung (s_y)
Berberin	324992
Coptisin	84216
Epiberberin	112722
Palmatin	48267

3.2.5.2.3.3.3 Verfahrensstandardabweichung (s_{x0})

Aus der Reststandardabweichung s_y und der Steigung m der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit E) errechnet sich die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} (Tab. 59) mit der Formel 14 (Seiten 170).

Tabelle 59: Verfahrensstandardabweichung

	Verfahrensstandardabweichung (s_{x0})
Berberin	1,6%
Coptisin	0,4%
Epiberberin	0,8%
Palmatin	0,2%

3.2.5.2.3.3.4 Relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Bei der rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird ausgehend von der Verfahrensstandardabweichung Bezug auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} genommen. Berechnet wurde die rel. Verfahrensstandardabweichung mit Formel 15 (Seite 170).

Tabelle 60: Rel. Verfahrensstandardabweichung (Coptis Alkaloide, HPLC)

	Rel. Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})
Berberin	2,1%
Coptisin	2,4%
Epiberberin	4,5%
Palmatin	1,9%

3.2.5.2.4 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve (Abb. 51) wurden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wurde eine polynomische Kurve berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Mit der allgemeinen Funktionsgleichung einer Parabel kann eine quadratische Regression (Tab. 61) erfolgen, Formel 16 (Seite 171). Mit den drei Parametern n , m und b kann eine quadratische Funktion zur Berechnung der Konzentrationen erstellt werden. Mit Formel 17 (Seite 171) bis Formel 24 (Seite 172) kann die Funktionsgleichung aufgestellt werden.

Tabelle 61: Funktionen nach quadr. Regression (Coptis Alkaloide, HPLC)

	Funktionen nach quadratischer Regression
Berberin	$y = -146x^2 + 227175x + 487400$
Coptisin	$y = -265x^2 + 213431x - 119689$
Epiberberin	$y = 1153x^2 + 96353x + 381279$
Palmatin	$y = -573x^2 + 245333x - 84423$

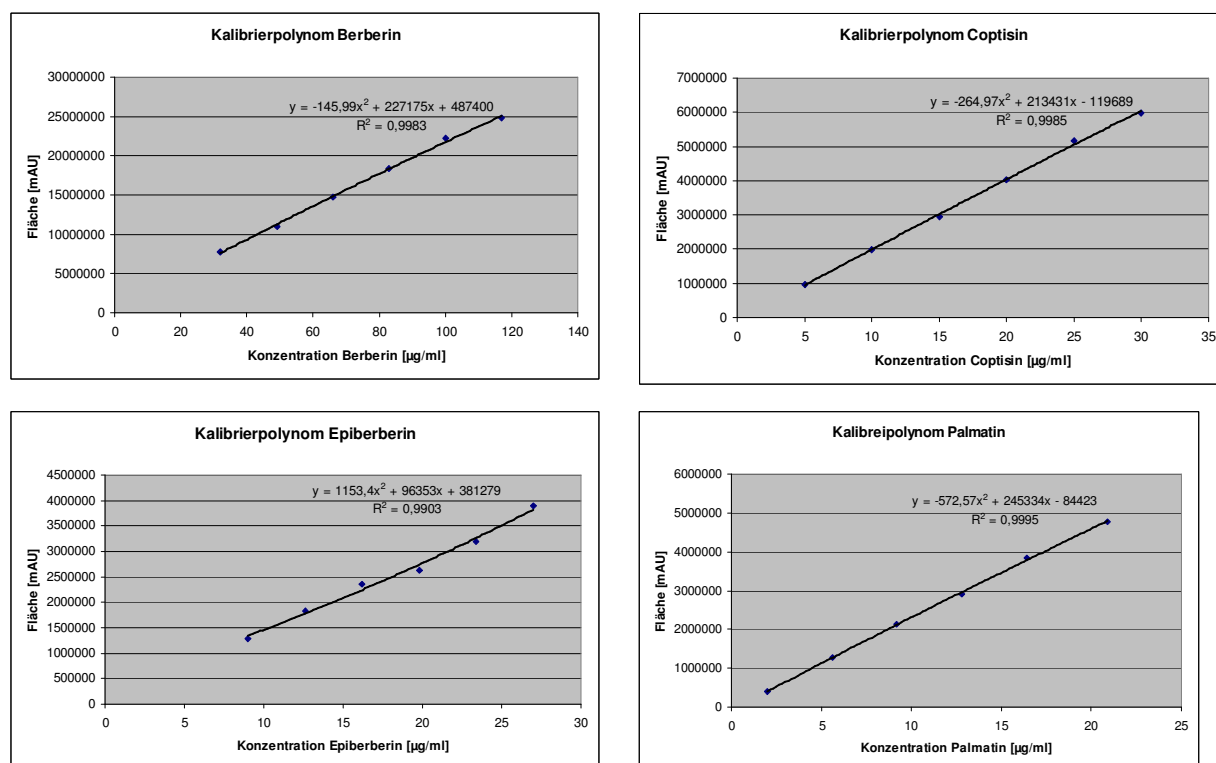


Abb 54: Kalibrierfunktionen nach quadratischer Regression (Coptis Alkaloide, HPLC)

3.2.5.2.4.1 Reststandardabweichung (s_y)

Die Reststandardabweichung (Tab. 62) berechnet sich nach Formel 25 (Seite 172).

Tabelle 62: Reststandardabweichung (Coptis Alkaloide, HPLC)

	Reststandardabweichung (s_y)
Berberin	344492
Coptisin	94395
Epiberberin	119000
Palmatin	47465

3.2.5.2.4.2 Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})

Die Verfahrensstandardabweichung (Tab. 63) berechnet sich nach Formel 26 (Seite 172).

Tabelle 63: Verfahrensstandardabweichung

	Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})
Berberin	1,7%
Coptisin	0,5%
Epiberberin	0,9%
Palmatin	0,2%

3.2.5.2.4.3 Relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung (Tab. 64) erfolgte mit Formel 28 (Seite 172).

Tabelle 64: Rel. Verfahrensstandardabweichung (Coptis Alkaloide, HPLC)

	Rel. Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})
Berberin	2,3%
Coptisin	2,6%
Epiberberin	4,8%
Palmatin	1,8%

3.2.5.2.5 Überprüfung der Varianzen von quadratischer und linearer Regression

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratischen und linearen Regressionskurven entfiel für die Kalibrierkurven von Berberin, Coptisin und Epiberberin, da die Verfahrensstandardabweichungen der linearen Regression kleiner waren als die der quadratischen Regression und somit die lineare Regression akzeptiert werden konnte. Für die Kalibrierkurve von Palmatin wurde ein Anpassungstest nach Mandel durchgeführt. Die Restvarianzdifferenz (Δs_y) der linearen und quadratischen Regression wurde nach Formel 37 (Seite 183) berechnet. Die Restvarianz (s_{yQ}^2) der quadratischen Regression berechnet sich aus der Reststandardabweichung der quadratischen Regression, die quadriert wird. Die Restvarianz und die Restvarianzdifferenz werden zu der Prüfgröße (PG) zusammengefasst. $PG = \Delta s_y / s_{yQ}^2$; mit $s_{yQ}^2 = 2252890957$ und $\Delta s_y = 2560153328$

Die Prüfgröße (PG) betrug 1,1; der tabellierte Wert der F-Tabelle ist mit 34,12 größer als die PG. Die Nullhypothese wurde angenommen, so dass die Auswertung ohne Anpassung der Konzentrationen erfolgen konnte.

3.2.5.2.6 Wiederholpräzision

Die Untersuchungslösungen wurden an einem Tag dreimal unabhängig voneinander hergestellt und wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben chromatographiert (Tab. 65). Die Wiederholpräzision der Methode ist akzeptierbar für den Fall dass der Variationskoeffizient (V_k) des Gehalts $\leq 5\%$ ist. Die Berechnung des V_k erfolgte mit Formel 3 (Seite 168).

Tabelle 65: Zusammenfassung der Wiederholpräzisionsergebnisse

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, WP1-3=Gehalt in Prozent der Messungen 1-3 der Wiederholpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin	WP1	14576488	14422779	14595743	16359965	16816155	7670663	17205650
Fläche [mAU]	WP2	14963171	14653740	14867750	16240503	17109733	8473787	17888485
	WP3	14958913	13942435	14588104	15711828	17013171	8163260	18588013
Gehalt [%]	WP1[%]	6,50	6,44	6,51	7,22	7,50	3,12	7,77
	WP2[%]	6,54	6,36	6,65	7,32	7,89	3,44	7,66
	WP3[%]	6,59	6,25	6,60	7,21	7,79	3,44	8,65
Laborpräzision	MW [%]	6,54	6,35	6,58	7,25	7,73	3,33	8,03
	STABWN[%]	0,03	0,08	0,06	0,05	0,16	0,15	0,44
	V_k [%]	0,51	1,23	0,87	0,67	2,13	4,59	5,51
Coptisin	WP1	4330474	4202756	4238278	4729431	4934326	2008922	2078641
Fläche [mAU]	WP2	4498288	4273082	4333087	4694873	4934038	2236414	2340083
	WP3	4519758	4068358	4246188	4590086	4990850	2144987	2454222
Gehalt [%]	WP1[%]	2,14	2,08	2,10	2,29	2,41	1,00	1,04
	WP2[%]	2,17	2,06	2,14	2,32	2,49	1,09	1,11
	WP3[%]	2,20	2,03	2,13	2,32	2,50	1,09	1,26
Laborpräzision	MW [%]	2,17	2,06	2,12	2,31	2,46	1,06	1,13
	STABWN[%]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,09
	V_k [%]	1,08	1,02	0,95	0,66	1,61	4,10	7,88
Epiberberin	WP1	2238547	2246024	2233175	2327975	2819942	169631	n.v.
Fläche [mAU]	WP2	2328619	2290026	2272697	2292968	2891542	185871	n.v.
	WP3	2330626	2179932	2232699	2243896	2968556	176866	n.v.
Gehalt [%]	WP1[%]	1,58	1,59	1,58	1,61	1,98	0,08	n.v.
	WP2[%]	1,61	1,57	1,61	1,62	2,10	0,09	n.v.
	WP3[%]	1,62	1,55	1,60	1,62	2,14	0,09	n.v.
Laborpräzision	MW [%]	1,60	1,57	1,59	1,62	2,07	0,09	n.v.
	STABWN[%]	0,02	0,02	0,01	0,00	0,07	0,00	n.v.
	V_k [%]	1,05	0,97	0,80	0,27	3,25	4,66	n.v.
Palmatin	WP1	3728048	3782814	3686765	4201936	3289729	1054090	1449902
Fläche [mAU]	WP2	3815801	3846122	3761915	4146720	3325927	1157958	1511699
	WP3	3853579	3666538	3681502	3983369	3377820	1133278	1608772
Gehalt in %	WP1[%]	1,61	1,64	1,60	1,78	1,41	0,46	0,64
	WP2[%]	1,61	1,62	1,63	1,80	1,47	0,50	0,63
	WP3[%]	1,64	1,60	1,62	1,76	1,48	0,51	0,72
Laborpräzision	MW [%]	1,62	1,62	1,61	1,78	1,45	0,49	0,66
	STABWN[%]	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,04
	V_k [%]	0,82	0,98	0,86	0,76	2,22	4,08	6,46

Die Auswertung der Laborpräzision zeigte für die Proben CrP7 Ergebnisse über 5,0 % relativer Standardabweichung. Die vermutete Ursache wurde bei der HPTLC-Quantifizierung diskutiert. In die Bewertung der Laborpräzision wurden nur die Ergebnisse der Untersuchung der Proben der kommerziellen Anbieter CrP1-CrP4 einbezogen. Die Untersuchung der Laborpräzision führt dann zu Ergebnissen unter 5,0 %, und der Test kann unter diesen Voraussetzungen akzeptiert werden.

3.2.5.2.7 Laborpräzision

Das unter 3.2.5.2.6 beschriebene Experiment wurde an 2 weiteren Tagen wiederholt. Das Kriterium für die Akzeptanz des Tests zur Laborpräzision der Methode war ein Variationskoeffizient (V_k) $\leq 5\%$.

Tabelle 66: Zusammenfassung der Laborpräzisionsergebnisse

CrP1-7=Coptidis rhizoma Probe 1-7, LP1-3=Gehalt in Prozent der Messung 1-3 der Wiederholpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Exccelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		CrP1	CrP2	CrP3	CrP4	CrP5	CrP6	CrP7
Berberin Fläche [mAU]	LP1	14576488	14422779	14595743	16359965	16816155	7670663	17205650
	LP2	14660865	14529208	14584382	16726405	16900751	8556147	16621923
	LP3	14719480	14271467	14668819	15918488	17858980	8046538	15025357
Gehalt [%]	LP1[%]	6,50	6,44	6,51	7,22	7,50	3,12	7,77
	LP2[%]	6,60	6,32	6,66	7,56	7,76	3,56	7,69
	LP3[%]	6,50	6,37	6,50	7,05	7,90	3,35	7,38
Laborpräzision	MW [%]	6,54	6,38	6,56	7,28	7,72	3,34	7,61
	STABWN[%]	0,05	0,046	0,07	0,21	0,17	0,18	0,17
	V_k [%]	0,73	0,72	1,12	2,93	2,14	5,41	2,24
Coptisin Fläche [mAU]	LP1	4330474	4202756	4238278	4729431	4934326	2008922	2078641
	LP2	4352477	4232991	4174215	4736710	4756013	2234076	2196699
	LP3	4347498	4155671	4193066	4551389	5267891	2084022	1842497
Gehalt [%]	LP1[%]	2,14	2,08	2,10	2,29	2,41	1,00	1,04
	LP2[%]	2,17	2,04	2,12	2,35	2,39	1,11	1,13
	LP3[%]	2,13	2,06	2,06	2,22	2,54	1,05	1,02
Wiederholpräzision	MW [%]	2,15	2,06	2,09	2,28	2,45	1,05	1,06
	STABWN[%]	0,02	0,016	0,02	0,05	0,07	0,05	0,05
	V_k [%]	0,88	0,76	1,06	2,30	2,66	4,43	4,48
Epiberberin Fläche [mAU]	LP1	2238547	2246024	2233175	2327975	2819942	169631	n.v.
	LP2	2278967	2269981	2205443	2343387	2829675	185613	n.v.
	LP3	2243667	2220799	2208781	2227438	3118611	173661	n.v.
Gehalt [%]	LP1[%]	1,58	1,59	1,58	1,61	1,98	0,08	n.v.
	LP2[%]	1,63	1,57	1,59	1,66	2,04	0,10	n.v.
	LP3[%]	1,57	1,57	1,55	1,55	2,16	0,09	n.v.
Laborpräzision	MW [%]	1,59	1,58	1,57	1,61	2,06	0,09	n.v.
	STABWN[%]	0,02	0,010	0,02	0,05	0,08	0,00	n.v.
	V_k [%]	1,54	0,62	1,17	2,81	3,73	5,46	n.v.
Palmatin Fläche [mAU]	LP1	3728048	3782814	3686765	4201936	3289729	1054090	1449902
	LP2	3769771	3829828	3687610	4302610	3271231	1188482	1491176
	LP3	3783419	3754277	3704498	4046011	3494076	1123815	1315991
Gehalt [%]	LP1[%]	1,61	1,64	1,60	1,78	1,41	0,46	0,64
	LP2[%]	1,65	1,62	1,63	1,86	1,44	0,52	0,67
	LP3[%]	1,62	1,63	1,59	1,73	1,48	0,50	0,64
Laborpräzision	MW [%]	1,63	1,63	1,61	1,79	1,44	0,49	0,65
	STABWN[%]	0,01	0,009	0,02	0,06	0,03	0,02	0,02
	V_k [%]	0,87	0,55	1,19	3,21	1,92	4,98	2,57

Die Auswertung der Wiederholpräzision zeigte für die Probe CrP6 Ergebnisse über 5,0 % relativer Standardabweichung. Dies wurde wie unter Kapitel 3.2.5.2.6 bewertet.

In die Bewertung der Laborpräzision wurden nur die Ergebnisse der Untersuchung der Proben CrP1 bis CrP4 der kommerziellen Anbieter einbezogen. Die Untersuchung der Laborpräzision führte dann zu Ergebnissen unter 5,0 % und der Test konnte akzeptiert werden.

3.2.5.2.8 Probenauswertung und Prognoseintervall

Mit den Kalibrierfunktionen konnten die Konzentrationen der Substanzen Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin in den unbekannten Proben abgeschätzt werden. Die Kalibrierfunktion Formel 4 (Seite 168) wurde zur Probenabschätzung nach x umgestellt. Der Mittelwert wurde aus den Untersuchungen der Laborpräzision gemittelt, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden auf den Mittelwert der fünf Präzisionsmessungen bezogen (Tab. 67-70).

Tabelle 67: Probenauswertung Berberin

Berberin	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4
Mittelwert Gehalt [%]	6,55	6,35	6,58	7,27
Standardabweichung [%]	0,04	0,06	0,07	0,17
Variationskoeffizient [%]	0,64	0,98	1,01	2,32

Tabelle 68: Probenauswertung Coptisin

Coptisin	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4
Mittelwert Gehalt [%]	2,16	2,06	2,11	2,30
Standardabweichung [%]	0,03	0,02	0,03	0,04
Variationskoeffizient [%]	1,17	0,84	1,36	1,94

Tabelle 69: Probenauswertung Epiberberin

Epiberberin	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4
Mittelwert Gehalt [%]	1,60	1,57	1,58	1,61
Standardabweichung [%]	0,02	0,01	0,02	0,04
Variationskoeffizient [%]	1,41	0,76	1,28	2,21

Tabelle 70: Probenauswertung Palmatin

Palmatin	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4
Mittelwert Gehalt [%]	1,63	1,62	1,61	1,79
Standardabweichung [%]	0,01	0,01	0,02	0,05
Variationskoeffizient [%]	0,88	0,80	1,05	2,58

Für die statistische Bewertung des Gesamtfehlers aus Kalibrierung und Messung der Proben wurde eine Berechnung angestellt. Da sich die Fehler aufsummieren und fortpflanzen, liegt die „wahre“ (jedoch unbekannte) Gerade zwischen zwei Hyperbeln (Funk W. [1997]). Das Wertepaar auf beiden Hyperbeln wurde mit Formel 32 (Seite 174) berechnet (Tab. 71).

Tabelle 71: Prognoseintervall (Coptis Alkaloide, HPLC)

	CrP1	CrP2	CrP3	CrP4
Prognoseintervall Gehalt Berberin [%]	6,55±0,27	6,35±0,27	6,58±0,27	7,27±0,27
Prognoseintervall Gehalt Coptisin [%]	2,16±0,07	2,06±0,07	2,11±0,07	2,30±0,08
Prognoseintervall Gehalt Epiberberin [%]	1,60±0,14	1,57±0,14	1,58±0,14	1,61±0,14
Prognoseintervall Gehalt Palmatin [%]	1,63±0,04	1,62±0,04	1,61±0,04	1,79±0,04

3.2.5.2.9 Robustheit

Es wurde ein Extrakt eines Anbieters hergestellt (welcher?). Das unter Kapitel 3.2.5.2 beschriebene Experiment wurde unter Veränderung der Säurekonzentration wiederholt. Die Konzentration der Säure wurde auf 0,7% in beiden Fließmitteln erhöht und die Probe dreimal vermessen. Der gemittelte Gehalt der berechneten Probe aus diesem Versuch durfte eine prozentuale Abweichung bezogen auf den berechneten Gehalt unter Kapitel 3.2.5.2.8 (Probenauswertung und Prognoseintervall) von $\pm 5\%$ nicht übersteigen.

Tabelle 72: Ergebnis Robustheitsuntersuchung (Coptis Alkaloide, HPLC)

Gehalt [%]	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin
MW Robustheitsuntersuchung	6,63	2,19	1,62	1,64
MW Probenauswertung	6,65	2,16	1,60	1,63
Abweichung bezogen auf MW Probenauswertung	-0,3%	1,39%	1,25%	0,61%

Die vermessene Probe lagen innerhalb der geforderten Grenze. Der Test konnte akzeptiert werden.

3.2.5.2.10 Wiederfindungsrate

Zu 103,2 mg einer genau eingewogenen Menge pulverisierte Droge von Coptidis rhizoma wurde eine bekannte Menge (1,41 mg) von Coptisin (in Lösung) gegeben. Diese Mischung wurde wie unter 3.2.5.2 beschrieben extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung berechnet sich nach Formel 34 (Seite 175).

Tabelle 73: Wiederfindung von Coptisin (HPLC)

Gehalt berechnet [mg]	Gehalt gemessen [%]	Gehalt gemessen [mg]	Wiederfindungsrate
6,55 % + 1,41 = 8,11	7,95	7,95	98,03%

3.2.5.2.11 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (Tab. 74) berechnet sich nach Formel 35 (Seite 175).

Tabelle 74: Nachweisgrenze (Coptis Alkaloide, HPLC)

Substanz	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin
Grenze [ng/ml]	5,22	1,36	2,70	0,69

3.2.5.2.12 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (Tab. 75) berechnet sich nach Formel 36 (Seite 176).

Tabelle 75: Bestimmungsgrenze Coptis Alkaloide, HPLC)

Substanz	Berberin	Coptisin	Epiberberin	Palmatin
Grenze [ng/ml]	15,82	4,13	8,18	2,08

3.3 Epiberberin

Im Rahmen der quantitativen Bestimmungen wurden die Substanzen Berberin, Coptisin, Palmatin und Epiberberin als Qualitätsmarker in *Coptidis rhizoma* ausgewählt, um eine möglichst umfassende Bestimmung der Alkaloidfraktion durchzuführen. Epiberberin wurde mit einbezogen, weil hier mit den unterschiedlichen monographierten *Coptis*-Species auch verschiedene Gehalte erwartet wurden. Dies war insbesondere aus den Dünnschichtchromatogrammen von WAGNER (2004) eindeutig erkennbar. Die vorher genannten Alkaloiden konnten, bis auf Epiberberin, bei verschiedenen Anbietern erworben werden. Um Epiberberin in *Coptidis rhizoma* quantifizieren zu können, musste die Referenzsubstanz isoliert und die Struktur verifiziert werden.

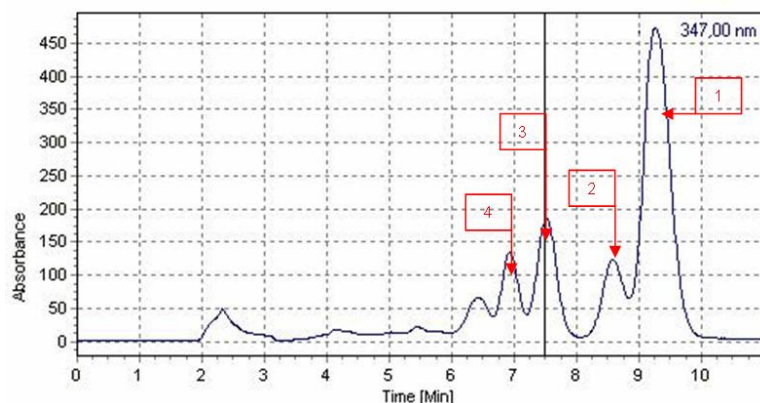
3.3.1 Isolierung

Zur Isolierung von Isochinolinalkaloiden vom Berberintyp konnten in der Literatur verschiedene Methoden gefunden werden. KATO (1996) isolierte Jatrorrhizin und Palmatin ebenso wie LEE (1999) Berberin und Palmatin mittels Ionenpaarchromatographie. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von verschiedenen Berberinderivaten zeigt MIN (2006) über Säulenchromatographie und Sephadex LH-20 und SUAU (1997) über Vakuumssäulenchromatographie.

Eine Isolierung mittels Ionenpaarreagenzien erschien nicht angebracht, da eine einmalige Verwendung einer Säule mit Ionenpaarreagenzien eine dauerhafte Widmung für diese Methode zur Folge hätte, eine routinemäßige Isolierung mittels Ionenpaarreagenzien aber nicht standardmäßig durchgeführt wird. Auch die weiteren vorher genannten Methoden führten nicht zum Ziel, da sich im Drogenmaterial die einzelnen Substanzen der Alkaloidfraktion nur geringfügig unterscheiden.

Zielführend war eine methanolische Extraktion des Drogenmaterials mittels Soxlethapparatur, Lösen des Extraktes in Dichlormethan, ausschütteln mit ammoniakalischem Methanol und einer Abreicherung von Jatrorrhizin im Rohextrakt gefolgt von einer semipreparativen HPLC.

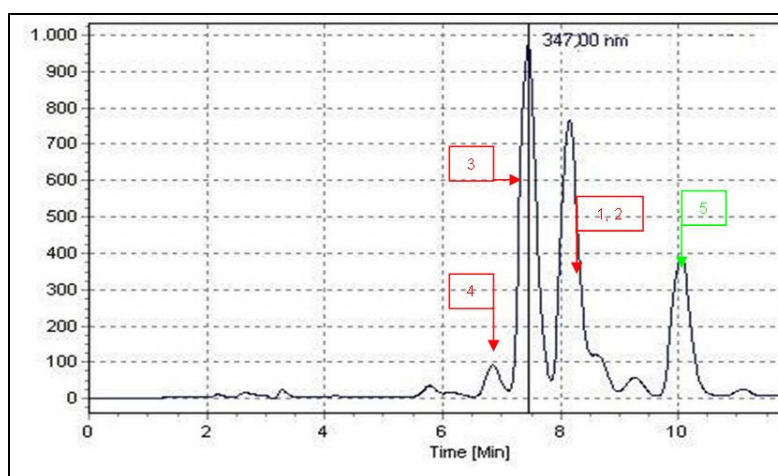
Zunächst wurden ca. 100 g gepulverte (355) Droge (*Coptis chinensis*) bei 60 °C in einer Soxhlet-Apparatur mit 250 ml Methanol 3 Tage extrahiert. Von dem erhaltene Rohextrakt wurde ein HPLC-Fingerprintchromatogramm erstellt (Abb. 52).



**Abb. 55: Chromatogramm/
Rohextrakt**

Peak 1: Berberin u. Palmatin, Peak 2: Coptisin, Peak 3: Epiberberin, Peak 4: Jatrorrhizin

Die erhaltene Lösung wurde unter reduziertem Druck bei 40°C eingengt und 10,3 g Rohextrakt erhalten. Jeweils 5 g Rohextrakt wurden in 150 ml Dichlormethan gelöst und dreimal mit 155 ml einer Mischung aus Methanol/25%-iger-Ammoniaklösung (150:5) ausgeschüttelt. Das Jatrorrhizin wird dabei vermutlich an der freien phenolischen OH-Gruppe deprotoniert und geht in der deprotonierten Form in den ammoniakalischen-Methanol über. In der Dichlormethan-Phase verbleibt ein Großteil der Alkaloide [Epiberberin (Peak 3 in Abb. 53; Peaks 1, 2 (Berberin, Palmatin, Coptisin)]. Bedingt durch die ammoniakalischen Bedingungen werden Artefakte gebildet was schon von MAREK (2003) und DORSAL (2004) beschrieben wurde. Diese sind im Chromatogramm als zusätzlicher Peak 5 ebenfalls sichtbar. Die Dichlormethan-Phase wurde erneut unter reduziertem Druck bei 40°C eingengt und zur Überprüfung des Vorgehens ein HPLC-Chromatogramm der ausgeschüttelten Fraktion angefertigt. Es konnten so ca. 3,5 g jatrorrhizinarmer Extrakt gewonnen werden (Abb. 53).



**Abb. 56: Chromatogramm
jatrorrhizinarme Phase**

Peak 1,2: Berberin, Palmatin, Coptisin, Peak 3: Epiberberin, Peak 4: Jatrorrhizin, Peak 5: Artefakte durch NH_3

Für die Aufreinigung des Epiberberins wurde eine semipräparative HPLC-Methode entwickelt.

Aus dem jatrorrhizinarmer Extrakt wurde eine methanolische Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Die Lösung wurde 10 min mit Ultraschall behandelt und anschließend durch einen 0,45-µm-Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wurde für die Isolierung verwendet. 100 µl der Untersuchungslösung wurden in eine HPLC-Anlage (Anlage spezifizieren!!!) mit DAD eingespritzt, als Trennsäule wird RP-Material [Knauer, 16 mm ID, Eurosphere 100, C-18, 7 µm] verwendet. Die Säulentemperatur lag bei 25°C, als Fließmittel diente A: Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure; B: Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure; in der Zusammensetzung: B 0 - 1 Minuten: 45%; 1 - 10 Minuten: 45% - 50%; 10 - 11 Minuten: 50% - 45%; 11 - 16 Minuten: 45%; mit einer Flußrate von 10,0 ml/ min und einer Detektionswellenlänge von 347 nm.

Es wurde eine Fraktion zwischen 7,25 min und 7,75 min aus dem Lauf geschnitten. Die vereinigten Fraktionen (Abb. 54) ergaben die Substanz Epiberberin mit einer Ausbeute von ca. 25 mg.

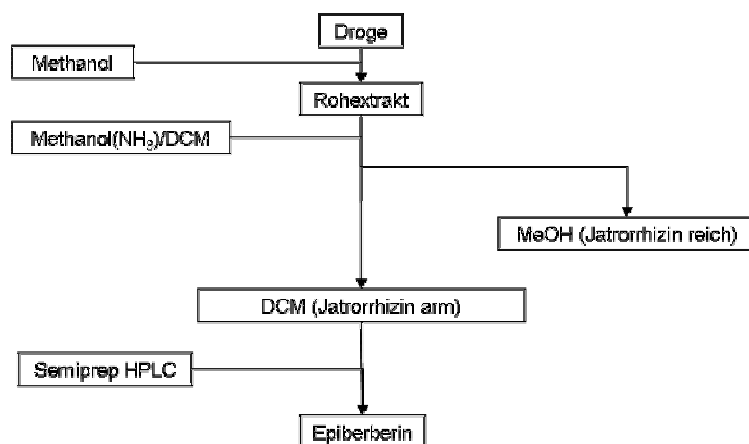
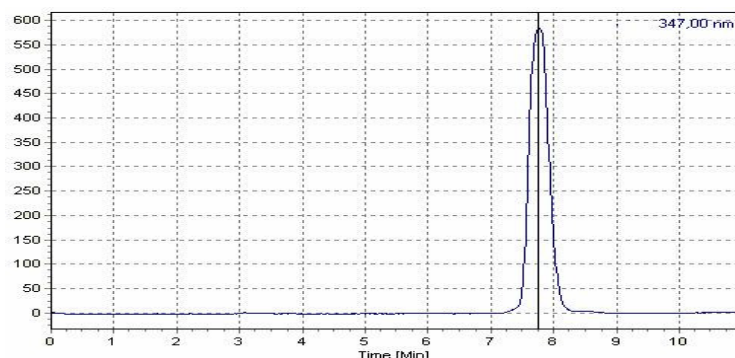


Abb 57: Extraktionsschema

Oben: HPLC Lauf für das Isolierte Epiberberin

Unten: Gepulverte Droge mit Methanol in Soxhlet extrahiert, Rohextrakt mit ammoniak.-MeOH/ Dichlormethan ausgeschüttelt, DCM Fraktion für Isolierung von Epiberberin mittel semipräparativer HPLC

3.3.2 Strukturüberprüfung

Für das vorher isolierte Epiberberin wurde die Masse des Moleküls per EI-MS mit 336,1 m/z gefunden, was mit einem berechneten Molgewicht von 336 g/mol übereinstimmt.

Die weitere Verifizierung der Struktur erfolgte mittels 1D und 2D NMR-Experimenten.

Tabelle 76: ^1H NMR Daten für Epiberberin (600 MHz, in CD_3OD , J in Hz)

H	Epiberberin
1	7,05 s
4	7,66 s
7	3,28 t (6,4)
8	4,89 t (6,4)
10	8,83 s
13	9,71 s
14	7,88 s
15	7,88 s
18	6,46 s
19	3,94 s
20	3,98 s

Tabelle 77: ^{13}C NMR Daten für Epiberberin (150 MHz, in CDCl_3)

C	Epiberberin
1	112,3
2	153,9
3	109,8
4	120,5
5	130,0
6	27,8
7	57,4
8	139,2
9	122,3
10	134,6
11	113,7
12	145,3
13	145,3
14	123,1
15	122,3
16	149,2
17	145,8
18	106,1
19	56,7
20	57,0

Die Shiftwerte der Signale in den ^1H und ^{13}C -Spektren (Tab. 76 und 77) stimmen mit den zu Epiberberin veröffentlichten Ergebnissen von TRIPATHI (2007) exzellent überein.

3.4 Forsythiae fructus

Forsythienfrüchte sind die reifen und getrockneten Früchte von *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. Die Droge wird im Herbst gesammelt und von fremden Bestandteilen befreit. Sie enthält mindestens 0,15 Prozent (*m/m*) Forsythosid A bezogen auf die getrocknete Droge.

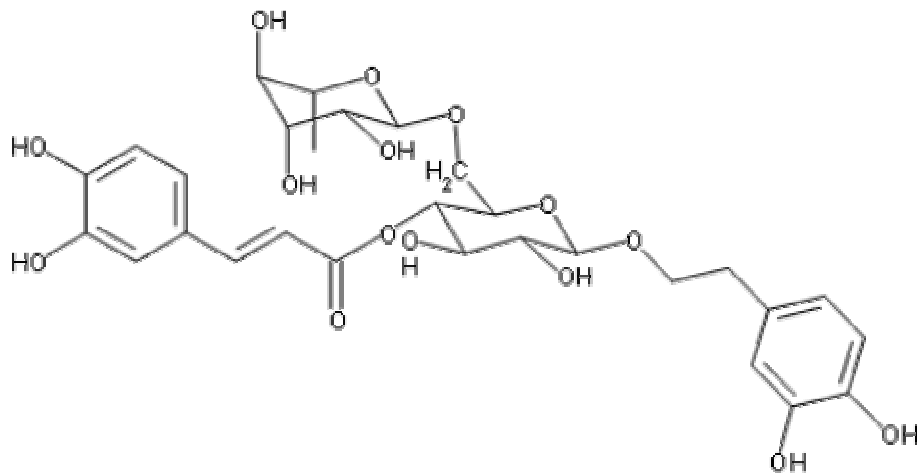


Abb: 58: Forsythosid A

3.4.1 Eigenschaften

Der Geruch ist eigentümlich, der Geschmack ist schwach bitter zusammenziehend, mehlig und schwach aromatisch.

3.4.2 Prüfung auf Identität

3.4.2.1 Makroskopische Prüfung

Die Früchte sind länglich oval, spitz zu laufend, leicht abgeflacht, 15 bis 25 mm lang, 5 bis 15 mm im Durchmesser und meist von der Spitze her aufgeplatzt oder in zwei Teile zerfallen. Es haftet ein Fruchtsiel an oder es ist eine Fruchtsielnarbe vorhanden. Die Fruchtoberfläche weist längsverlaufende unregelmäßige Runzeln auf, zahlreiche Makula sind vorhanden. Die Farbe der äußeren Oberfläche ist gelb-braun bis rot-braun. Die innere Oberfläche ist gelb-braun, glatt, mit einem länglichen Septum, dessen Gewebe brüchig ist (Abb. 59 und 60).



Abb. 59: Forsythiae fructus Übersicht



Abb. 60: Forsythiae fructus Detail

3.4.2.2 Mikroskopische Prüfung

Die Droge wurde pulverisiert (355). Das Pulver ist orange-braun. Die Prüfung erfolgte unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat Lösung R verwendet wurde. Das Pulver von Forsythiae fructus zeigte folgende Merkmale:

Parenchymatische Zellverbände, in der Aufsicht fünf bis sechseckig mit gelb-braunen Zellwänden, einer Breite von 25 – 50 µm, einer Länge von 30 -60 µm und einer Zellwandbreite von 3 µm; selten Gefäßfragmente; Steinzellen, oft in mehrschichtigen Verbänden (bis zu fünf Schichten), einzelne Steinzellen länglich, mit unterschiedlicher Breite, Länge und Zellwanddicke. Vereinzelt sind Epidermisfragmente mit Cuticula zu erkennen (Abb. 61-65).

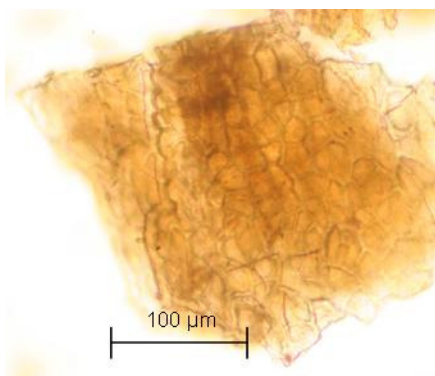


Abb. 61: Cuticulafragment
100-fache Vergrößerung, Chloralhydrataufhellung, Cuticula in Aufsicht

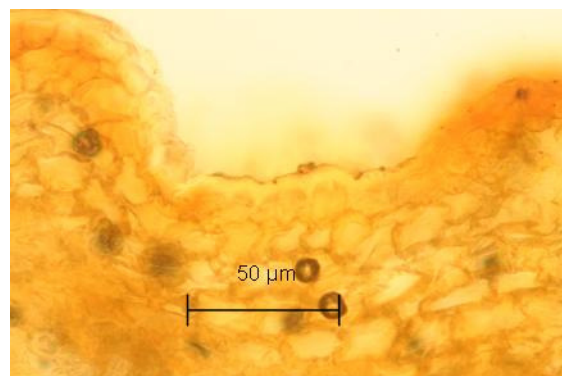


Abb. 62: Cuticulaquerschnitt
200-fache Vergrößerung, Sudan-III-Färbung, Cuticula in Querschnitt

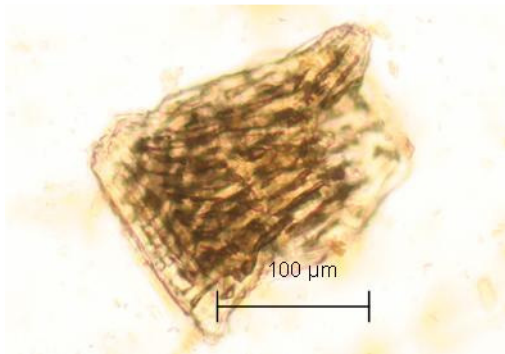


Abb. 63: Steinzellenverband
100-fache Vergrößerung, Chloralhydrataufhellung

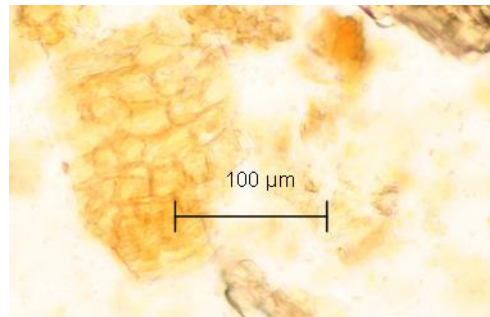


Abb. 64: Parenchymatische Zellen
100-fache Vergrößerung, Chloralhydrataufhellung

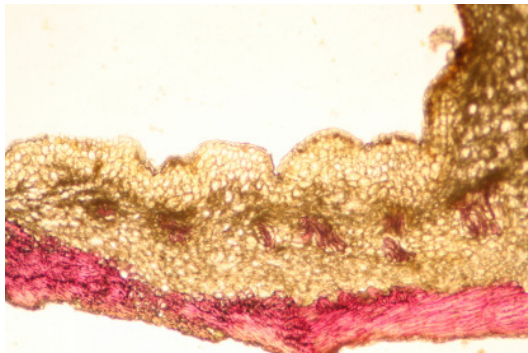


Abb. 65: Fruchtquerschnitt
Von oben nach unten: Cuticula (eine Zellreihe), darauf folgend parenchymatische Zellen in die Gefäße (teilw. rotgefärbt) eingelagert sind; unten ein mehrschichtiger Verband sklerenchymatische Zellen (rotgefärbt); Färbung: Phloroglucin und Salzsäure

3.4.2.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Für die Identitätsprüfung sind bereits verschiedene Methoden entwickelt worden. In der Monographie Fructus Forsythiae der Ph. VR China (2005d) wird die Droge aufwendig extrahiert und mit einer Mischung aus Toluol, Ethylacetat, Ameisensäure und Wasser entwickelt. In der Methode nach WAGNER (2005) wird mit Methanol unter Rückfluss extrahiert und dann das DC in einer Mischung von Chloroform und Methanol entwickelt. Auf Grund der Toxizität von Chloroform wird auf diese Fließmittel verzichtet.

Es wurde daher eine neue Methode entwickelt. Hierbei wurden 1,0 g Droge (355) mit 10 ml Methanol im Ultraschallbad 10 min extrahiert und durch einen Faltenfilter sowie einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtert. Das Endfiltrat diente als Untersuchungslösung. Die Referenzsubstanzen Arctiin, Phillyrin, Pinoresinol, Salidroside wurden von WAGNER (2005) übernommen. Für die Entwicklung auf Kieselgel 60 F₂₅₄ wurde mit einer Mischung aus Toluol/Aceton/Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser (40:50:60:6:6) gearbeitet. Die Dokumentation erfolgte nach Derivatisierung mit Vanilin-Reagenz bei UV-366 nm und Tageslicht.

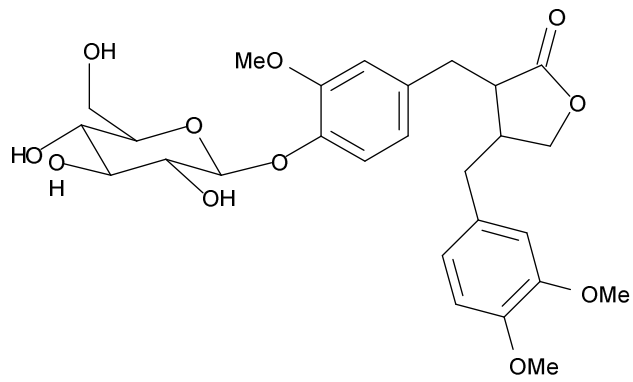


Abb: 66: Arctiin

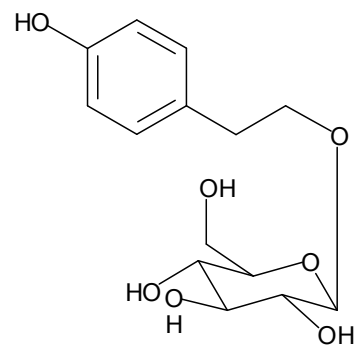


Abb: 67: Salidroside

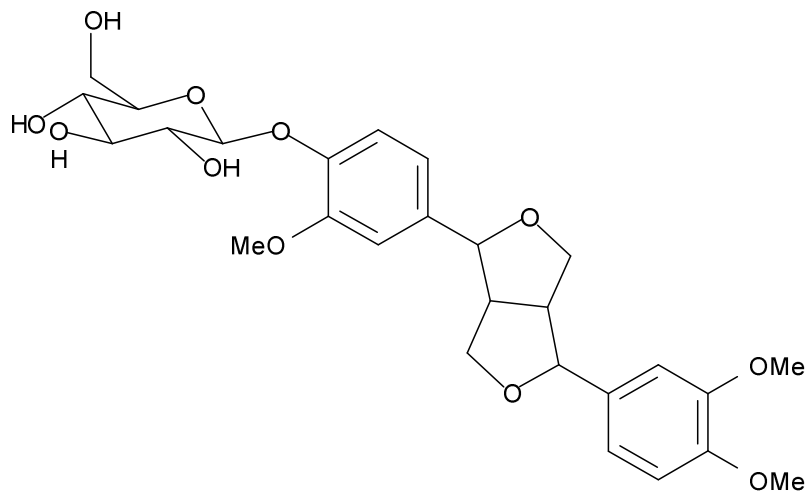


Abb: 68: Phillyrin

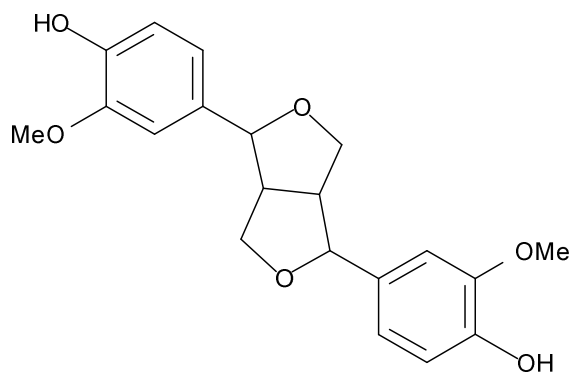


Abb: 69: Pinosresinol

3.4.2.3.1 Stabilität während der Chromatographie

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde der Extrakt punktförmig am Plattenrand aufgetragen ein Mal entwickelt, getrocknet, die Platte um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Die Analyten der Untersuchungslösung lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden und es zeigten sich keine Abbauprodukte abseits der Winkelhalbierenden (Abb. 70 und 71). Die Stabilität der Analyten während der Chromatographie ist somit gezeigt worden.

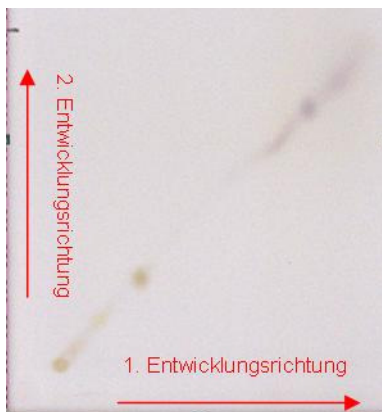


Abb. 70: 2-D Entwicklung, Tageslicht

1 µl Forsythiae fructus Extrakt punktförmig aufgetragen und 2-mal entwickelt. Nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein weiteres Mal entwickelt. Bild aufgenommen nach Derivatisierung mit Vanilin/Schwefelsäure Reagenz bei Tageslicht Platte: Forsythia_080218_01_01

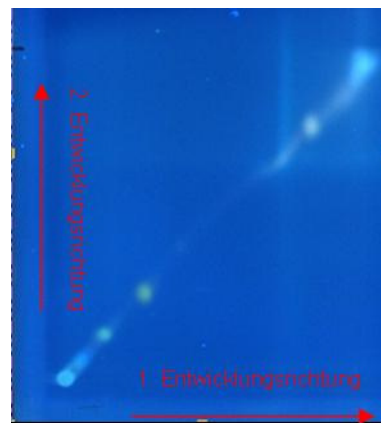


Abb. 71: 2-D Entwicklung 366 nm

1 µl Forsythiae fructus Extrakt punktförmig aufgetragen und 2-mal entwickelt. Nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein weiteres Mal entwickelt. Bild aufgenommen nach Derivatisierung mit Vanilin/Schwefelsäure Reagenz bei 366 nm, Platte: Forsythia_080218_01_01

Während der Chromatographie zeigten sich keine Veränderungen. Der Test konnte akzeptiert werden.

3.4.2.3.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für diese Prüfung wurden zwei Extrakte im Abstand von zwei Stunden hergestellt. Ein Aliquot des ersten Extraktes wurde sofort auf die Platte aufgetragen. Die verbleibende Lösung wurde verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine zweite Lösung wurde bis zum Ablauf der zwei Stunden hergestellt. Diese Lösung wurde zweimal direkt auf die Platte aufgetragen. Als vierte Bande wurde im Anschluss die Lösung aufgetragen, die zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war.

Nach Entwickeln, Derivatisieren und Dokumentieren der Platten durften sich bei visueller Auswertung der einzelnen Bahnen auf der Platte keine Unterschiede der Farben und Farbintensitäten der einzelnen Banden ergeben. Der Fingerprint musste identisch sein.

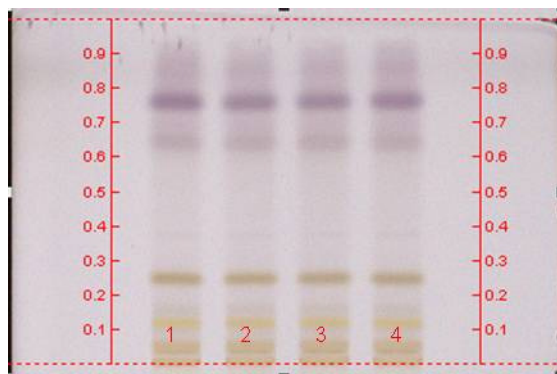


Abb. 72: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung, Tageslicht

Bahn 1: Forsythiae fructus Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Forsythiae fructus Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Forsythiae fructus Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Forsythiae fructus Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen, Bild nach Derivatisierung mit Vanilin/Schwefelsäure Reagenz bei Tageslicht; Fließmittel: Toluol/Aceton/Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6), Auftragevolumen 5 µl je Bande

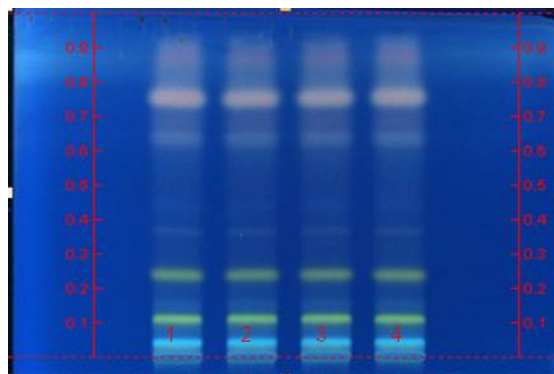


Abb. 73: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung

Bahn 1: Forsythiae fructus Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Forsythiae fructus Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Forsythiae fructus Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Forsythiae fructus Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen, Bild nach Derivatisierung mit Vanilin/Schwefelsäure Reagenz bei 366 nm; Fließmittel: Toluol/Aceton/Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6), Auftragevolumen 5 µl je Bande

Die Auswertung der Chromatogramme (Abb. 72 und 73) ergab keinen Unterschied im Fingerprint der aufgetragenen Extrakte. Eine Auswertung war unter den beschriebenen Bedingungen ohne Probleme möglich.

Der Test auf Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte konnte akzeptiert werden.

3.4.2.3.3 Stabilität der Derivatisierung

Zur Beurteilung der Stabilität der Derivatisierung nach Entwickeln der Platte wurde jeweils nach 5 Minuten (Abb. 74 u. 75), nach 30 Minuten und nach 60 Minuten (Abb. 74 u. 75) ein Bild bei 366 nm und bei Tageslicht gemacht. Die Stabilität wurde akzeptiert, wenn ohne starke Veränderungen der Farben und Farbintensitäten eine Auswertung nach 30 Minuten möglich war.

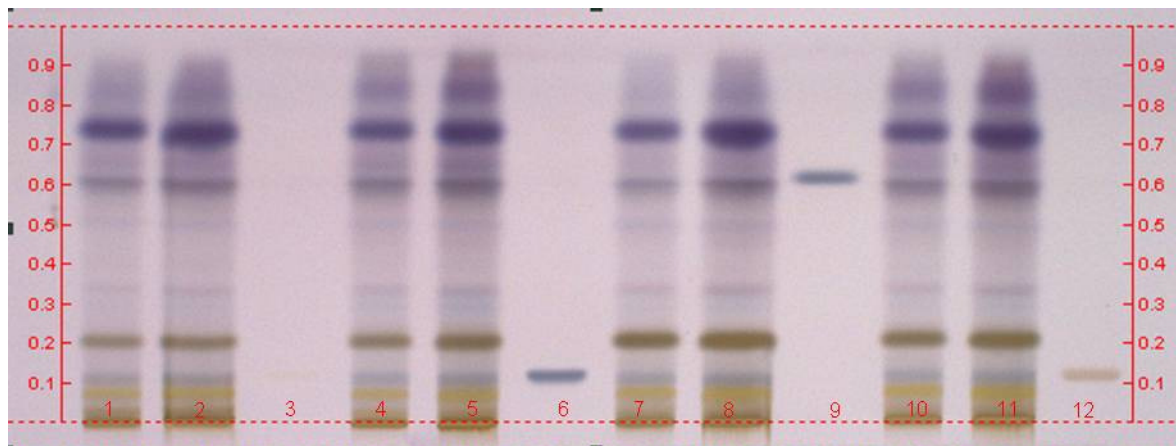


Abb. 74: Stabilität der Derivatisierung, 5 min

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia suspensa fructus Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei Tageslicht nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz; Aufnahme 5 Minuten nach Entwicklung, Platte: Forsythia_080222_01_01

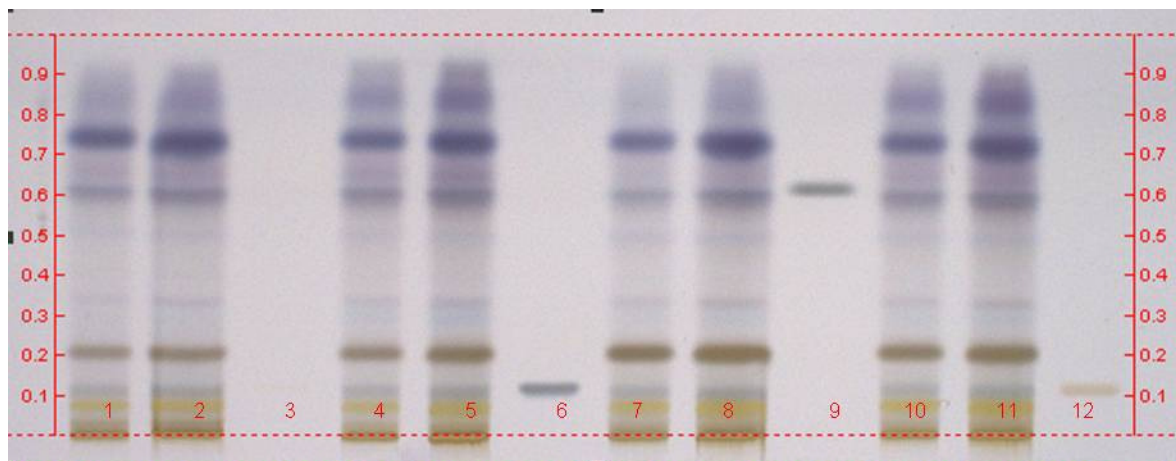


Abb. 75: Stabilität der Derivatisierung, 30 min

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia suspensa fructus Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei Tageslicht nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz; Aufnahme 30 Minuten nach Entwicklung, Platte: Forsythia_080222_01_01

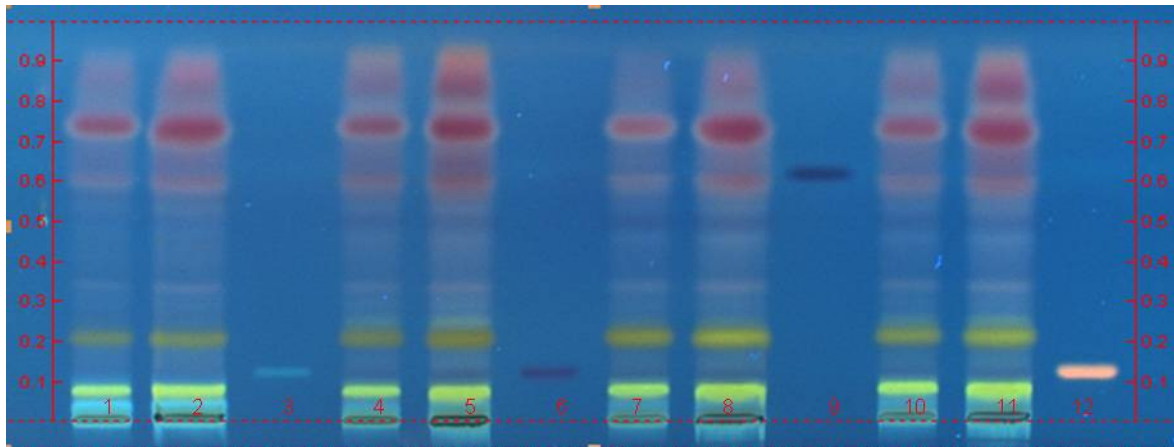


Abb. 76: Stabilität der Derivatisierung, 5 min

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia suspensa fructus Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei 366 nm nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz; Aufnahme 5 Minuten nach Entwicklung, Platte: Forsythia_080222_01_01

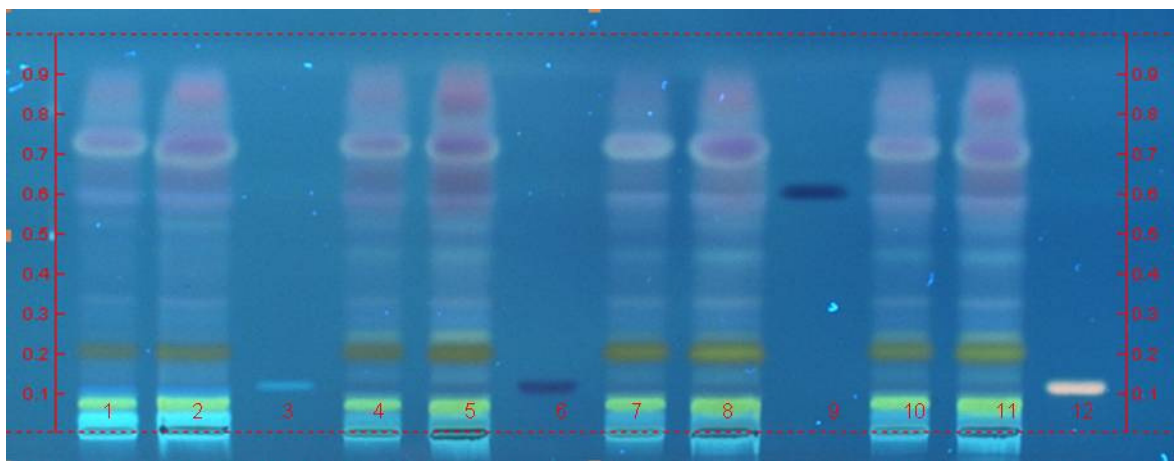


Abb. 77: Stabilität der Derivatisierung, 30 min

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia suspensa fructus Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei Tageslicht nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz; Aufnahme 30 Minuten nach Entwicklung, Platte: Forsythia_080222_01_01

Während der festgelegten Zeit von 30 Minuten ergaben sich bezüglich der Farbe und Intensität der Banden nur unwesentliche Veränderungen der Derivatisierung, die Auswertung des Chromatogramms konnte ohne Einschränkungen erfolgen. Der Test zur Stabilität der Derivatisierung konnte akzeptiert werden.

3.4.2.3.4 Spezifität

3.4.2.3.4.1 Identifizierung von *Forsythiae fructus* Proben durch Vergleichen authentischer Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Die Untersuchung wurde wie unter Kapitel 3.4.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Methode wurde als spezifisch angesehen, wenn beim erhaltenen Fingerprint-Chromatogramm (Abb. 78 u. 79) folgende Banden vorhanden sind: gelbe Bande (7), gelbe Bande (6) und rote Bande (5) der Auswertung nach Derivatisierung mit Vanilin-Reagen mussten im UV-Licht bei 366 nm und bei Tageslicht erkennbar sein.

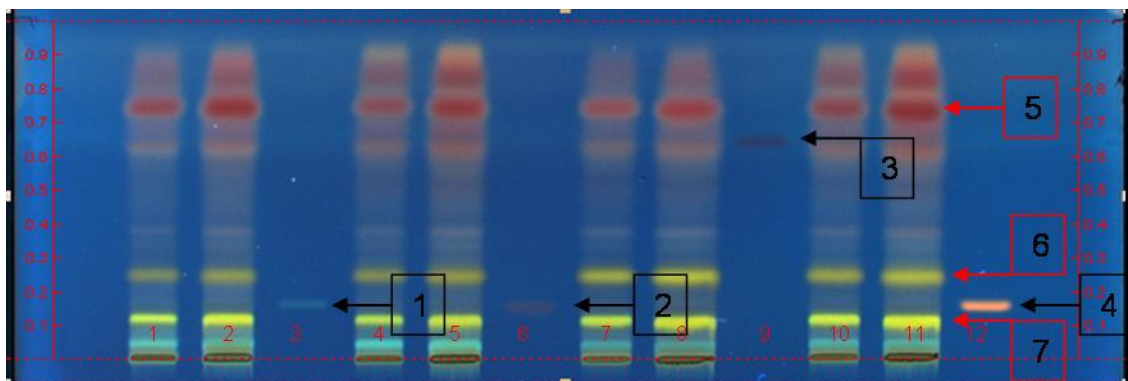


Abb. 78: Spezifität (*Forsythiae fructus*), 366 nm

Markierungen: 1: Arctiin, 2: Phillyrin, 3: Pinoresinol, 4: Salidroside; 5: rote Bande, 6: zweite gelbe Bande, 7: erste gelbe Bande, Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl *Forsythiae fructus* Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/ Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei 366 nm nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz

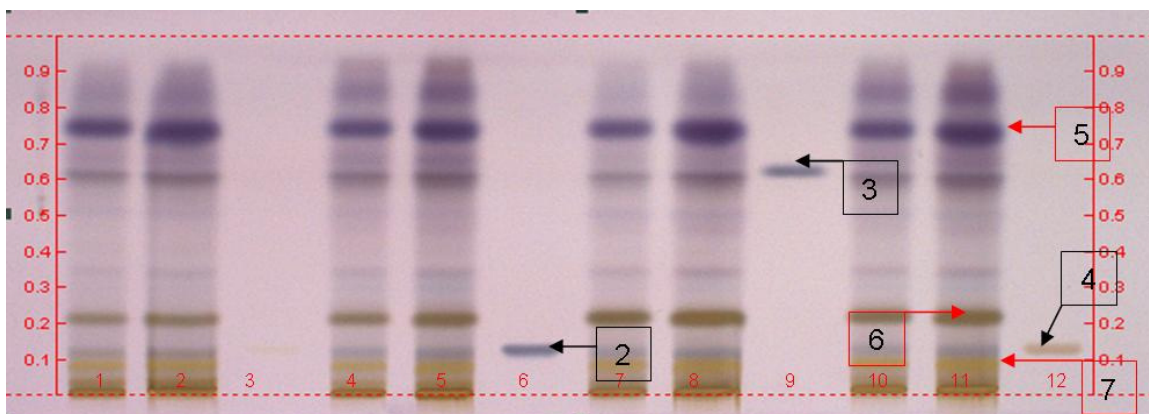


Abb. 79: Spezifität (*Forsythiae fructus*), Tageslicht

Markierungen 1: Arctiin, 2: Phillyrin, 3: Pinoresinol, 4: Salidroside; 5: rote Bande, 6: zweite gelbe Bande, 7: erste gelbe Bande; Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl *Forsythiae fructus* Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/ Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion bei Tageslicht nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz

Für die Durchführung des Spezifitätstests (Abb. 80-82) konnte kein authentisches (botanisch eindeutig identifizierte Probe) Drogenmaterial erhalten werden. Die vorhandenen

Drogenproben wurden nebeneinander in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Es konnten nur im oberen R_F -Bereich bei 0,6/0,8 Unterschiede in Form von vorhandenen oder nicht vorhandenen (Doppel-) Banden festgestellt werden (Abb. 80). Hierbei handelte es sich um sehr geringfügige Variationen des Fingerprints, wahrscheinlich durch Artefaktbildung während der Trocknung und Extraktion der Droge. Diese Unterschiede waren geringfügig und nur vor der Derivatisierung im UV-Licht bei 366 nm erkennbar. Probleme bei der Identifizierung entstanden dadurch nicht.

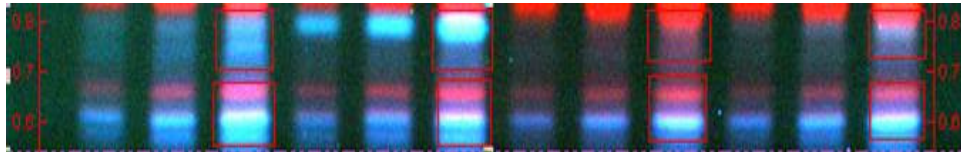


Abb. 80: Chromatogrammausschnitt (Fingerprint *Forsythiae fructus*)

Forsythiae fructus Extrakte, Bahn 1-3 FfP1 (3,5,10 μ l), Bahn 4-6 FfP2 (3,5,10 μ l), Bahn 7-9 FfP3 (3,5,10 μ l), Bahn 10-12 FfP4 (3,5,10 μ l); Unterschiedliche blaue Banden im R_F -Bereich 0,6/0,8 rot gekennzeichnet, Detektion bei 366 nm ohne Derivatisierung, Platte: Forsythia_080222_01_04

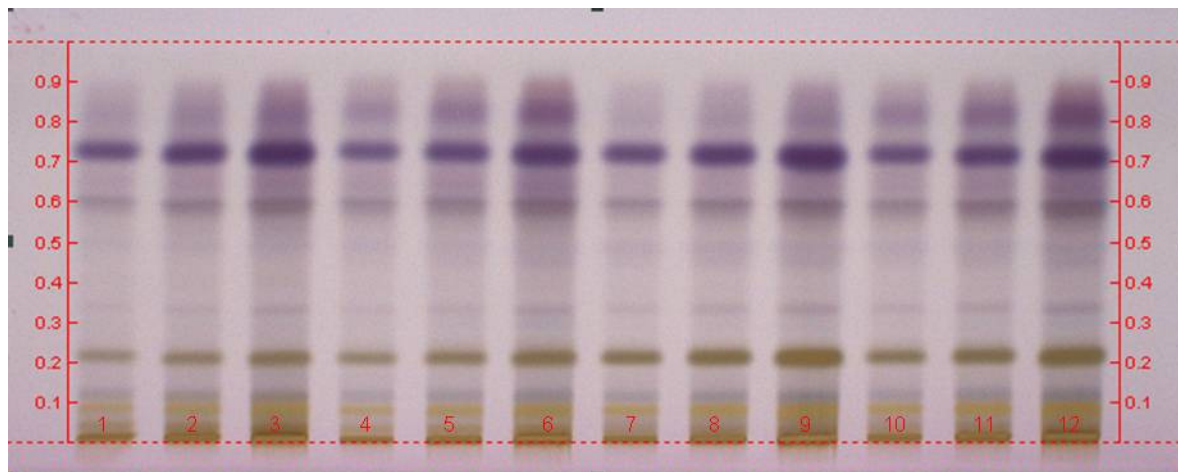


Abb. 81: Spezifität *Forsythiae fructus* (Tageslicht)

Forsythiae fructus Extrakte, Bahn 1-3 FfP1 (3,5,10 μ l), Bahn 4-6 FfP2 (3,5,10 μ l), Bahn 7-9 FfP3 (3,5,10 μ l), Bahn 10-12 FfP4 (3,5,10 μ l), Auswertung nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz bei Tageslicht, Platte: Forsythia_080222_01_04

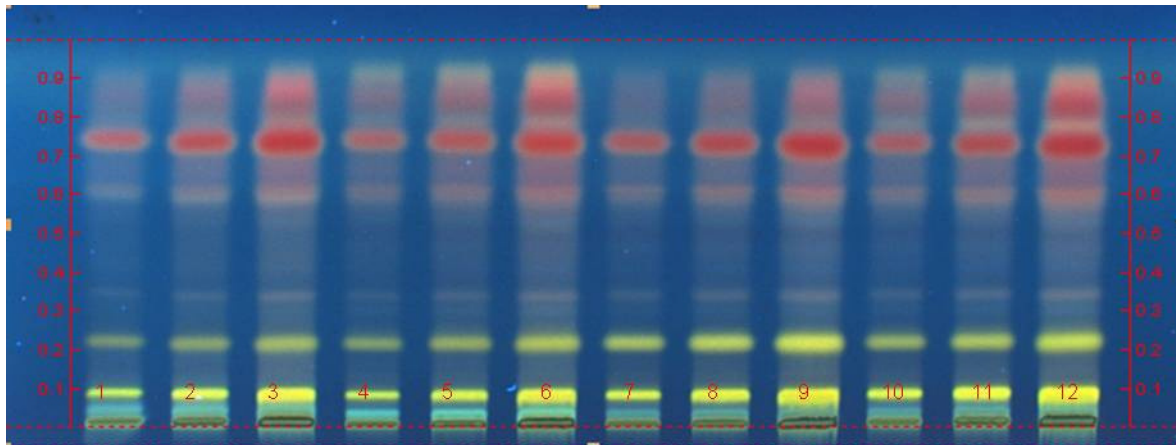


Abb. 82: Spezifität Forsythiae fructus (UV 366 nm)

Forsythiae fructus Extrakte, Bahn 1-3 FfP1 (3,5,10µl), Bahn 4-6 FfP2 (3,5,10µl), Bahn 7-9 FfP3 (3,5,10µl), Bahn 10-12 FfP4 (3,5,10µl); Auswertung nach Derivatisierung mit Vanilin/ Schwefelsäure Reagenz bei 366 nm, Platte: Forsythia_080222_01_04

Die Auswertung des Bandenmusters nach Derivatisierung bei UV 366 nm und Tageslicht ergab bei allen vier Drogenextrakten denselben Fingerprint. Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.4.2.3.4.2 Detektion von Verfälschungen

Der Test konnte wegen fehlender Verfälschungen nicht durchgeführt werden. Das charakteristische makroskopische Aussehen der Probe erlaubt aber vermutlich eine etwaige Verfälschung oder Verunreinigung durch Sichtprüfung auszuschließen.

3.4.2.3.5 Wiederholpräzision

Für die Untersuchung der Wiederholpräzision wurden an einem Tag drei Chromatogramme unabhängig von einander entwickelt. Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit Vanillin/Schwefelsäurereagenz derivatisiert, erhitzt und bei 366 nm sowie bei Tageslicht die Dokumentation durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen (Tab. 78 und Abb. 83, 84) wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Identität identisch waren. Die Banden sollten auf der Platte parallel ohne Kurven oder Wellen verlaufen. Die R_F -Werte der vorher spezifizierten Banden durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,03 R_F -Werteinheiten von einander abweichen.

Tabelle 78: Ergebnis der HPTLC-Wiederholpräzision (*Forsythiae fructus*)

Für die repräsentativen Banden ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,03 R_F-Werteinheiten (Ziffern in Klammern nehmen Bezug auf die in den Abb. 78 und 79 gewählten Markierungen)

Bande (Nr.)	Plattenbezeichnung			ΔR_F
	Forsythia_080220_01_02	Forsythia_080220_01_03	Forsythia_080220_01_04	
	R _F			
1. gelbe Bande (7)	0,12	0,11	0,11	0,01
2. gelbe Bande (6)	0,24	0,23	0,23	0,01
rote Bande(5)	0,75	0,75	0,76	0,01
Arctiin (1)	0,16	0,16	0,15	0,01
Phillyrin (2)	0,16	0,16	0,15	0,01
Pinoresinol (3)	0,65	0,64	0,65	0,01
Salidrosid (4)	0,16	0,16	0,15	0,01

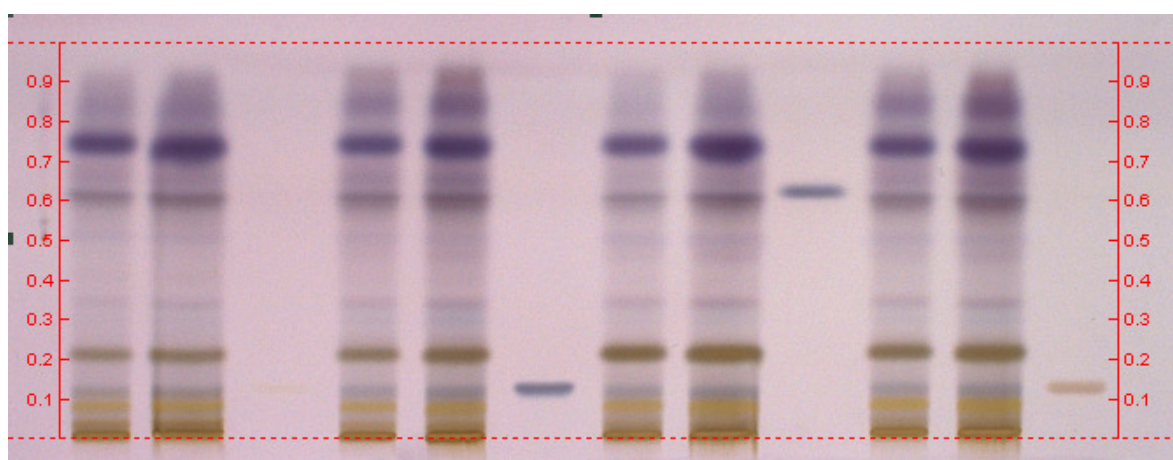


Abb. 83: HPTLC-Wiederholpräzision (*Forsythiae fructus*), Tageslicht

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl *Forsythia suspensa fructus* Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidrosid (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Bild nach Derivatisierung mit Vanillin/Schwefelsäure Reagenz bei Tageslicht, Platte: Forsythia_080220_01_02

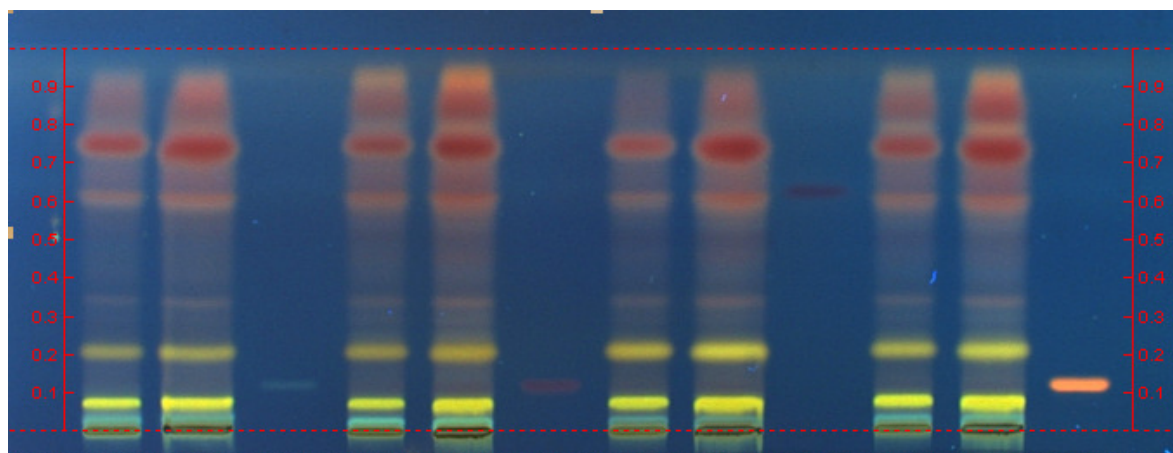


Abb. 84: HPTLC-Wiederholpräzision (*Forsythiae fructus*), 366 nm

Untersuchungslösungen; Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl *Forsythia suspensa fructus* Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidrosid (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Bild nach Derivatisierung mit Vanillin/Schwefelsäure Reagenz bei 366 nm, Platte: Forsythia_080220_01_02

Die Ergebnisse der Wiederholpräzision lagen innerhalb der geforderten Grenzen. Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden.

3.4.2.3.6 Laborpräzision

Für die Überprüfung der Laborpräzision wurde an drei aufeinander folgenden Tagen ein Chromatogramm entwickelt (Bedingungen und Ergebnisse Tab. 79). Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit Vanillin/Schwefelsäurereagenz derivatisiert, erhitzt und die Dokumentation durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Identität identisch waren. Die Banden auf der Platte parallel verlaufen ohne Kurven oder Wellen. Die R_F -Werte der vorher spezifizierten Banden dürfen auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F -Werteinheiten von einander abweichen.

Tabelle 79: Ergebnis der HPTLC-Laborpräzision

Die Ziffern in Klammern nehmen Bezug auf die in den Abbildungen 78 und 79 gewählten Markierungen. Für die repräsentativen Banden ergaben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 R_F -Werteinheiten; Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10 μ l Forsythia suspensa fructus Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30 μ l, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30 μ l, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30 μ l, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 μ l, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6);

	Plattenbezeichnung			
	Forsythia_ 080220_01_02	Forsythia_ 080221_01_01a	Forsythia_ 080222_01_01	
Bande (Nr.)	R_F			ΔR_F
1. gelbe Bande (7)	0,12	0,11	0,09	0,03
2. gelbe Bande (6)	0,24	0,24	0,22	0,02
rote Bande(5)	0,75	0,74	0,74	0,01
Arctiin (1)	0,16	0,15	0,12	0,03
Phillyrin (2)	0,16	0,15	0,12	0,04
Pinoresinol (3)	0,65	0,65	0,63	0,02
Salidroside (4)	0,16	0,15	0,12	0,03

Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Untersuchung der Laborpräzision akzeptiert werden.

3.4.2.3.7 Robustheit

3.4.2.3.7.1 Plattentyp

Es wurde eine DC-Aluminiumfolie mit einer HPTLC-Glasplatte verglichen. Für die HPTLC-Platte wurde die Methode wie unter Kapitel 6.6.5.4 beschrieben durchgeführt. Für die DC-Aluminiumfolie wurde die Methode unter Ausnahme der Kapitel 6.6.5.4.4 und 6.6.5.4.7 durchgeführt. Für eine Übertragung der Methode auf kieselgelbeschichtete DC-Aluminiumfolien (Abb. 85 und 86) wurde eine entsprechende Untersuchung durchgeführt. Als Ziellaufstrecke wurden 100 mm gewählt, die vom Hersteller als optimale Trennstrecke angegeben sind. Die Entwicklung erfolgt in einer 200x200 mm Doppeltrogkammer. Für den Vergleich wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung verwendet.

Die Kriterien für die Akzeptanz des Tests waren, dass alle Banden in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Zonen für die beiden entwickelten Platten gleich waren. Ein Unterschied der repräsentativen Banden von nicht größer als 0,06 R_F-Einheiten wurde als akzeptabel angesehen.

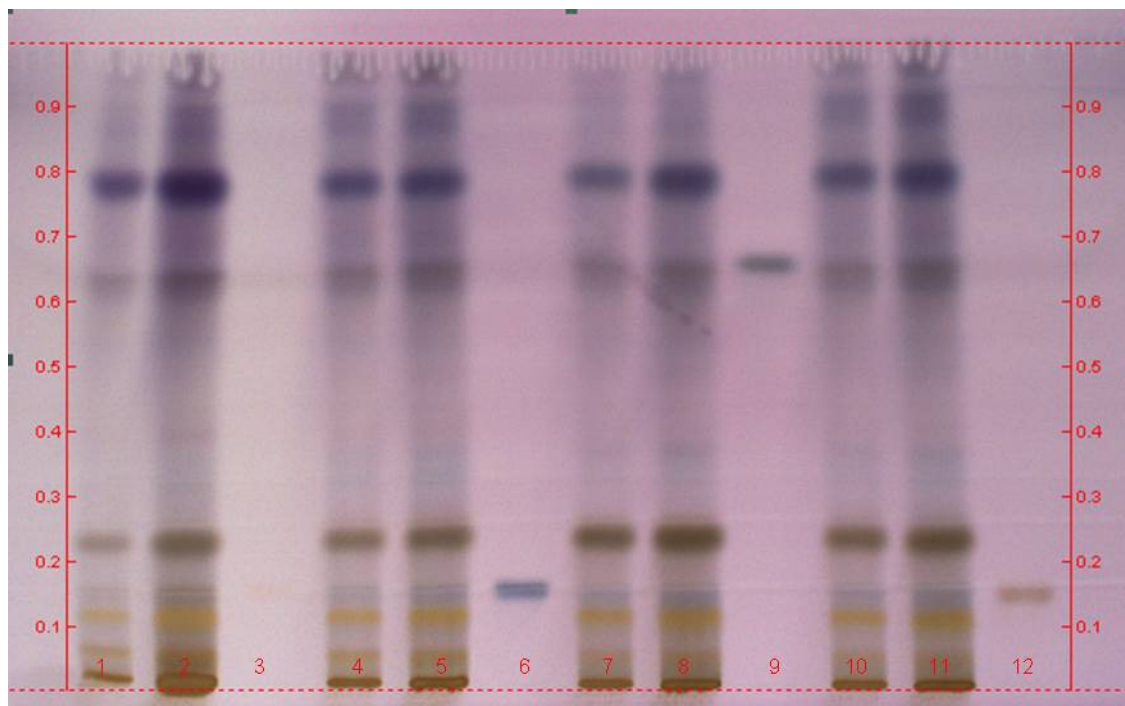


Abb. 85: DC Robustheit (*Forsythiae fructus*), DC-Aluminiumfolie mit Kieselgel

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10 µl *Forsythia suspensa fructus* Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30 µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Laufstrecke 100 mm; Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, Tageslicht; Platte: Forsythia_080225_01_01

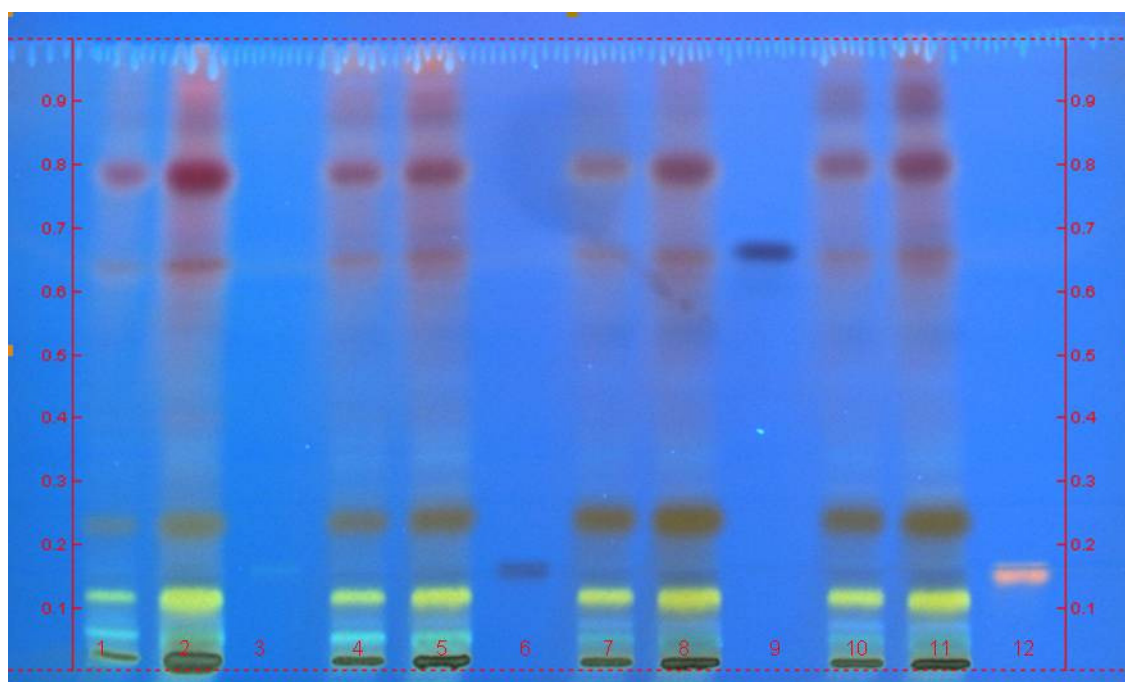


Abb. 86: DC-Robustheit (*Forsythiae fructus*), DC-Aluminiumfolie mit Kieselgel

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10 µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30 µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Laufstrecke 100 mm; Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, Laufstrecke 100 mm; UV 366 nm; Platte: Forsythia_080225_01_01

Tabelle 80: Ergebnis der Robustheitsuntersuchung bezüglich des Plattentyps

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10 µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30 µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30 µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Laufstrecke 100 mm; Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, Laufstrecke 100 mm

	Plattenbezeichnung		
	DC-Aluminiumfolie Forsythia_080225_01_01	HPTLC-Glasplatte Forsythia_080220_01_02	
Bande	R_F		ΔR_F
1. gelbe Bande	0,11	0,12	0,01
2. gelbe Bande	0,24	0,24	0,00
mittlere rote Bande	0,78	0,75	0,03
Arctiin	0,15	0,16	0,01
Phillyrin	0,15	0,16	0,01
Pinoresinol	0,66	0,65	0,01
Salidroside	0,14	0,16	0,02

Die Untersuchung der Robustheit bezüglich des Plattentyps zeigten keine Abweichungen außerhalb der geforderten 0,06 R_F -Werteinheiten (Tab. 80).

3.4.2.3.7.2 Entwicklungsstrecke

Es wurde die Methode (unter Ausnahme der Entwicklungsstrecke) wie unter Punkt 6.6.5.4 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Platte mit einer Laufstrecke von 70 mm (Abb. 87 und 89) und eine mit einer Laufstrecke von 50 mm (Abb. 88 und 90) entwickelt. Für den Vergleich wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung verwendet.

Die Kriterien für die Akzeptanz des Tests waren, dass alle Banden für die beiden entwickelten Platten in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Zonen gleich sind. Ein Unterschied der repräsentativen Banden von nicht größer als 0,06 R_F -Einheiten wurde akzeptiert.

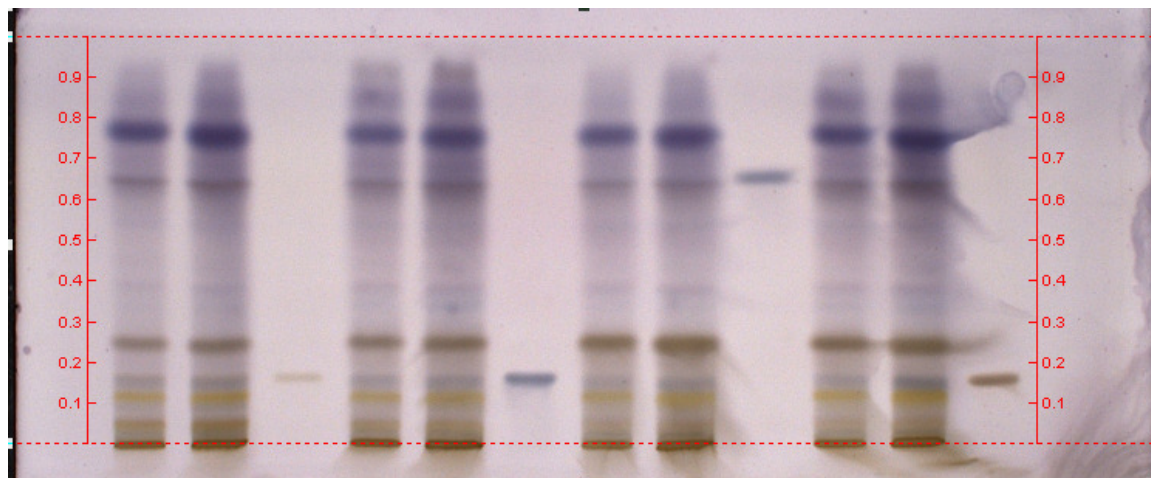


Abb. 87: HPTLC-Robustheit (*Forsythiae fructus*), 70 mm, Tageslicht

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, Tageslicht Laufstrecke 70 mm; Platte: Forsythia_080221_01_02

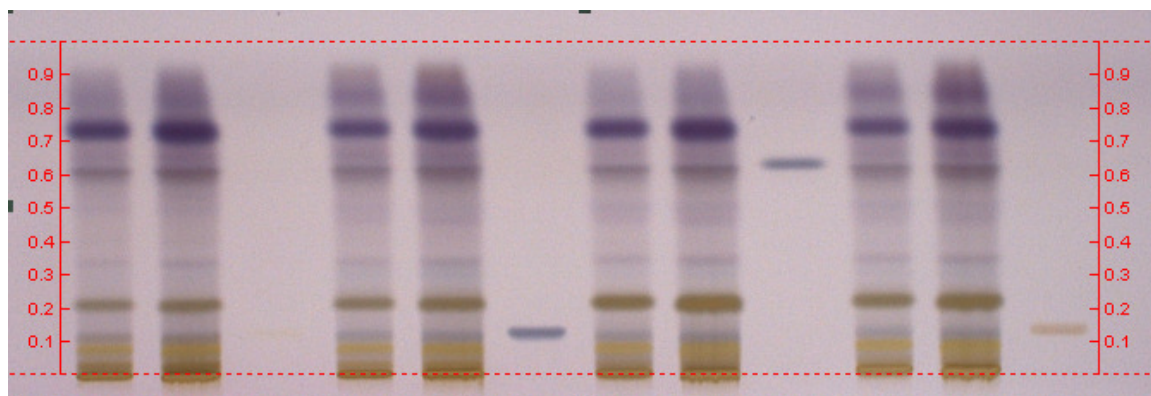


Abb. 88: HPTLC-Robustheit (*Forsythiae fructus*), 50 mm, Tageslicht

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, Tageslicht Laufstrecke 50 mm; Platte: Forsythia_080222_01_02

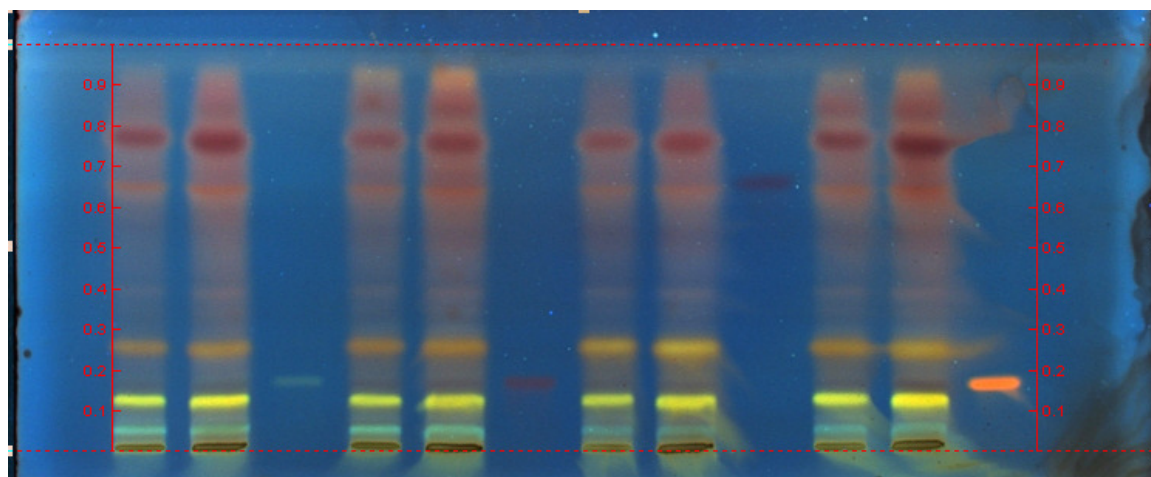


Abb. 89: HPTLC-Robustheit Forsythiae fructus), 70 mm, 366 nm

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, UV 366nm Laufstrecke 70 mm; Platte: Forsythia_080221_01_02

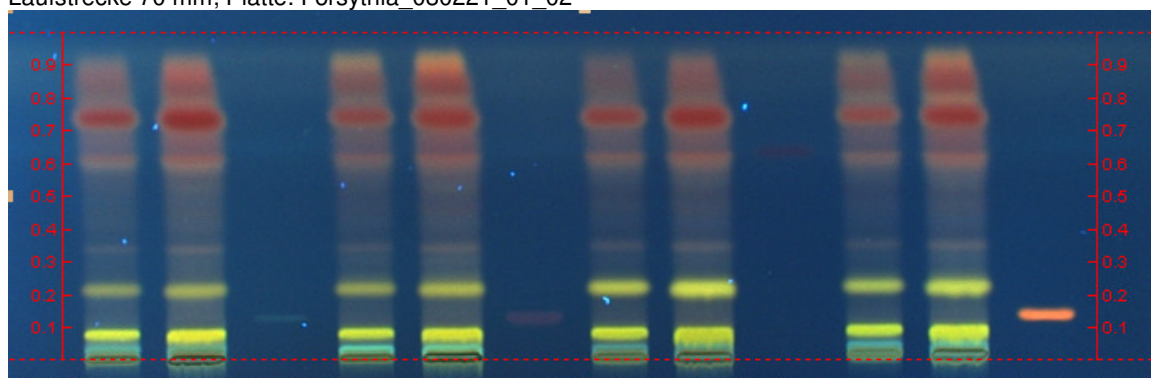


Abb. 90: HPTLC-Robustheit (Forsythiae fructus), 50 mm, 366 nm

Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz, UV 366nm Laufstrecke 50 mm; Platte: Forsythia_080222_01_02

Tabelle 81: Ergebnis der Robustheitsuntersuchung (Forsythiae fructus)

Für alle Referenzsubstanzen ergaben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 R_F -Werteinheiten, Untersuchungslösungen Bahn 1,2,4,5,7,8,10,11: FfP1-FfP4 (jeweils 5 und 10µl Forsythia Extrakt); Referenzsubstanzen: Bahn 3 Arctiin (30µl, 0,18 mg/ml), Bahn 6 Phillyrin (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 9 Pinoresinol (30µl, 0,14 mg/ml), Bahn 12 Salidroside (30 µl, 0,12 mg/ml); Fließmittel Toluol/ Aceton/ Ethylacetat/Ameisensäure/wasser (40:50:60:6:6); Detektion: Vanillin/Schwefelsäure Reagenz

	Platte: Forsythia_080222_01_02 50 mm	Platte: Forsythia_080220_01_02 60 mm	Platte: Forsythia_080221_01_02 70 mm	
Bande	R_F			ΔR_F
1. gelbe Bande	0,08	0,12	0,13	0,05
2. gelbe Bande	0,22	0,24	0,26	0,04
rote Bande	0,74	0,75	0,77	0,03
Arctiin	0,14	0,16	0,17	0,03
Phillyrin	0,14	0,16	0,17	0,03
Pinoresinol	0,64	0,65	0,66	0,02
Salidroside	0,14	0,16	0,17	0,03

Die Untersuchung der Robustheit bezüglich der Laufstrecke zeigten keine Abweichungen außerhalb der geforderten 0,06 R_F -Werteinheiten (Tab. 81).

Die Experimente zur Prüfung der Robustheit konnten akzeptiert werden.

3.4.3 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g Droge in ein Wägegglas genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet.

Tabelle 82: Trocknungsverlust Forsythiae fructus

MW [%]: Mittelwert des Trocknungsverlustes der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe			
	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
	Trocknungsverlust [%]:			
1. Einwaage	8,45	8,02	8,28	7,91
2. Einwaage	8,63	7,93	8,24	7,95
3. Einwaage	8,42	8,02	8,17	7,93
MW [%]	8,50	7,99	8,23	7,93
STABWN [%]	0,0905	0,0444	0,0448	0,0162
Varianz [%]	1,0647	0,5555	0,5450	0,2038

3.4.4 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g pulverisierte Droge [355] in einen Quarztiegel genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet. Anschließend wurde das Pulver im Muffelofen bei 600 °C zur Massenkonstanz geglüht.

Tabelle 83: Bestimmung der Asche von Forsythiae fructus

MW [%]: Mittelwert der Asche der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe			
	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
	Asche [%]			
1. Einwaage	2,51	2,20	2,62	2,97
2. Einwaage	2,52	2,24	2,60	2,96
3. Einwaage	2,52	2,20	2,59	2,92
MW [%]	2,52	2,21	2,60	2,95
STABWN [%]	0,0044	0,0163	0,0115	0,0188
Varianz [%]	0,18	0,74	0,44	0,64

3.4.5 Gehaltsbestimmung von Forsythosid A

Ausgangspunkt für die Gehaltsbestimmungen waren die Monographie Fructus Forsythiae aus der Ph. VR China (2005d) und die Monographie von WAGNER (2005)

3.4.5.1 Gehaltsbestimmung mittels HPTLC

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren Fließmittelgemische für die Trennung von Flavonoiden auf Kieselgel-Platten für die Identitätsprüfung von Birkenblättern, Arnikablüten, Lindenblüten, Weißdornblätter mit Blüten aus PLANT DRUG ANALYSIS (1996) sowie eine Methode von JANICSAK G. (2007). Ein hinreichend gute Trennung des Forsythosid A von anderen Kaffeesäurederivaten konnte mit den beschriebenen Methoden nicht erzielt werden. Eine weitere Möglichkeit bestand darin die Trennung auf RP-Material durchzuführen. Hierfür wurden Methoden von STEFANIAK M. (2008), MISZCZYK M. (2006) und GABRIELS M. (2004) für den Einstieg verwendet. Für die Gehaltsbestimmung mittels HPTLC wurde im Folgenden eine neue Methode entwickelt. Es wurden 2,0 g gepulverte (355) Droge mit 100 ml Methanol versetzt, im Wasserbad unter Rückfluss für 30 Minuten bei 65°C extrahiert, und anschließend durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wurde als Testlösung verwendet. Die Trennung erfolgt auf HPTLC- RP- 18 W F₂₅₄S – Platten mit Acetonitril/Wasser 20:80 (+1% Ameisensäure im Gesamtanteil). Die Dokumentation erfolgt bei UV 366 nm.

Auf eine Derivatisierung mit Naturstoffreagenz/Polyethylenglycol wurde verzichtet, da sich herausstellte, dass die Ergebnisse einer zu großen Schwankung unterlagen (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.4.5.1.1 Stabilitätsuntersuchungen

3.4.5.1.1.1 Stabilität der Analyten während der Chromatographie

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde der Extrakt punktförmig am Plattenrand aufgetragen, ein Mal entwickelt und getrocknet. Die Platte wurde um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Die Analyten der Untersuchungslösung lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden und es zeigten sich keine Abbauprodukte die Abseits der Winkelhalbierenden zu erkennen wären. Die Stabilität der Analyten während der Chromatographie war somit gezeigt.

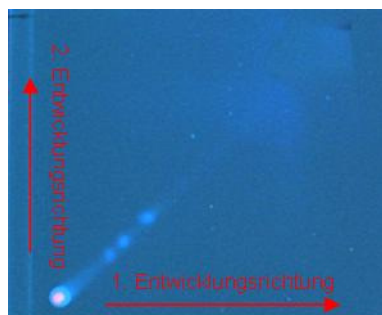


Abb. 91: 2-D Entwicklung (Forsythiae fructus)

1 µl Forsythiae fructus Extrakt punktförmig aufgetragen, 2-mal entwickelt, nach der 1. Entwicklung Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2.-mal entwickelt, bei 366 nm, Acetonitril/Wasser 20:80 +1% Ameisensäure, Platte: Forsythia_20090305_02

Die getrennten Substanzen (Abb. 91) lagen auf einer Geraden und zeigten keine Abbauprodukte im 2D-Chromatogramm. Der Test auf Stabilität während der Chromatographie konnte akzeptiert werden.

3.4.5.1.1.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für diese Prüfung wurden zwei Extrakte im Abstand von zwei Stunden hergestellt. Ein Aliquot des ersten Extrakts wurde sofort auf die Platte aufgetragen. Die verbleibende Lösung wurde verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine zweite Lösung wurde vor Ablauf der zwei Stunden hergestellt. Diese Lösung wurde zweimal direkt auf die Platte aufgetragen. Als vierte Bahn wurde im Anschluss die zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrte Lösung aufgetragen.

Nach Entwicklung und Dokumentation der Platte durften sich bei Auswertung der Bande von Forsythosid A die Signalwerte der Peakflächen um nicht mehr als 15% bezogen auf die frisch hergestellten Lösungen verändern.

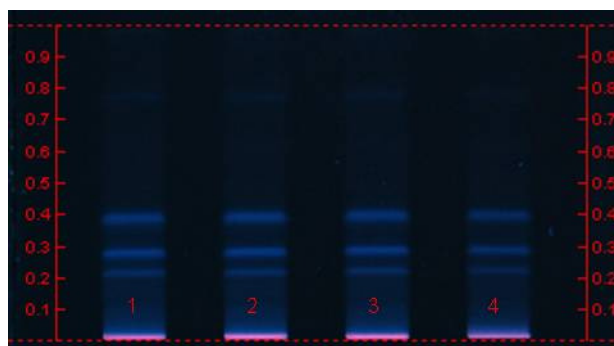


Abb. 92: Stabilität der Analyten (Forsythiae fructus, Platte/Lösung)

Bahn 1: Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Extrakt 2 h in Lösung, dann aufgetragen
 Bild bei 366 nm, Platte: Forsythia_20090316_02

Tabelle 84: Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen (Forsythiae fructus)

Bahn	Signalwert [mAU]	Einwaage [g]	Signalwert [mAU/2,0g]	MW Bahn 2+3 [mAU/2,0g]	Signalwert/ MW Bahn 2+3
1	1632	2,07113	1576	1761	0,89
2	1751	2,05160	1707		0,97
3	1863	2,05160	1816		1,03
4	1290	2,07113	1246		0,71

MW Bahn 2+3 = Mittelwert der Signalwerte von Bahn 2 und 3

Die Schwankungen der auf Bahn 2 und 3 aufgetragenen Untersuchungslösungen zeigten Schwankungen von 3% bezogen auf den Mittelwert. Für die Probe die sich 2 Stunden auf der Platte befindet zeigte sich eine Signalabnahme von ca. 11%. Für die Probe die sich 2 Stunden in methanolischer Lösung befand nimmt das Signal um 29% ab (Tab. 84). Das Experiment für die Prüfung der Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung kann akzeptiert werden, jedoch muss als Konsequenz aus der beobachteten Signalabnahme die Messung zeitnah durchgeführt werden.

3.4.5.1.1.3 Stabilität der Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden mit frisch hergestellten Extrakten und Referenzsubstanzmischungen durchgeführt. Nach Entwickeln und Dokumentieren der Platte durften sich bei Auswertung der Bande von Forsythosid A die Signalwerte der Peakflächen um nicht mehr als 10% bezogen auf den Anfangswert verändern.

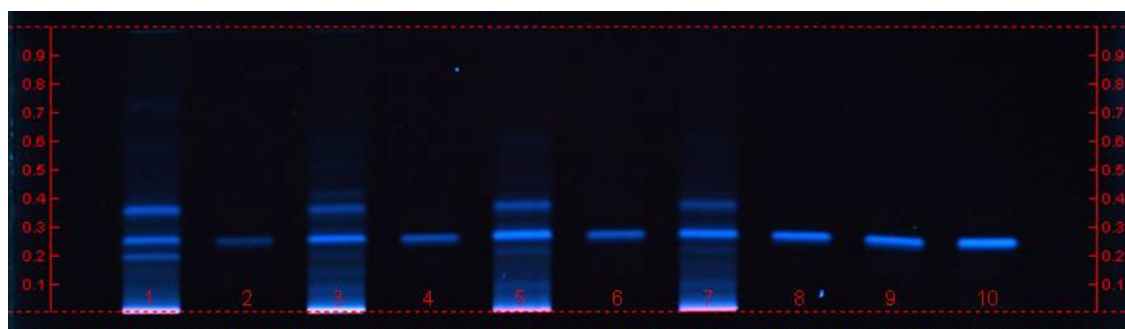


Abb. 93: Stabilität des Ergebnis T_0 (Forsythiae fructus)

Untersuchungslösungen: Bahn 1,3,5,7 Forsythia suspensa fructus Extrakt FfP1-4; Referenzsubstanzlösung Level 1-6: Bahn 2 (0,3 µg; 0,1mg/ml), Bahn 4 (0,46 µg; 0,15mg/ml), Bahn 6 (0,53µg; 0,175 mg/ml), Bahn 8 (0,56 µg; 0,187mg/ml), Bahn 9 (1,2 µg; 0,4 mg/ml), Bahn 10 (1,65 µg; 0,55 mg/ml); Fließmittel Acetonitril/Wasser 20:80 +1% Ameisensäure; Detektion UV 366 nm; Platte: Forsythia_20090317_01_03

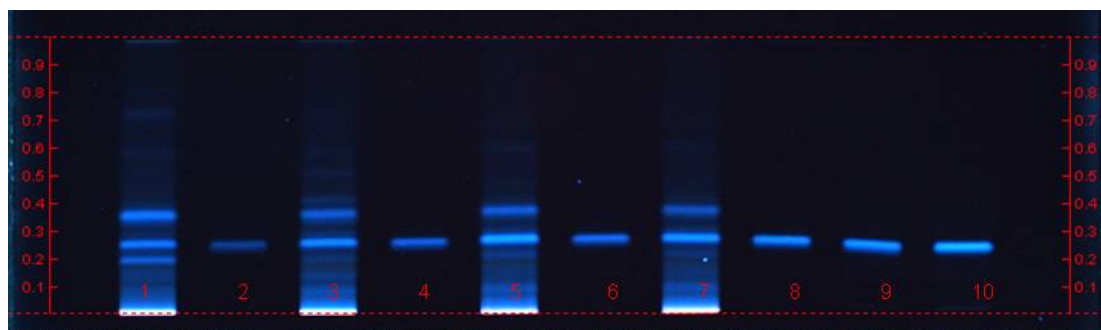


Abb. 94: Stabilität des Ergebnis T_{30} (Forsythiae fructus)

Untersuchungslösungen: Bahn 1,3,5,7 Forsythia suspensa fructus Extrakt FfP1-4; Referenzsubstanzlösung Level 1-6: Bahn 2 (0,3 µg; 0,1mg/ml), Bahn 4 (0,46 µg; 0,15mg/ml), Bahn 6 (0,53µg; 0,175 mg/ml), Bahn 8 (0,56 µg; 0,187mg/ml), Bahn 9 (1,2 µg; 0,4 mg/ml), Bahn 10 (1,65 µg; 0,55 mg/ml); Fließmittel Acetonitril/Wasser 20:80 +1% Ameisensäure; Detektion UV 366 nm; Platte: Forsythia_20090317_01_03

Tabelle 85: Ergebniszusammenfassung Stabilität der Ergebnisse (Forsythiae fructus)

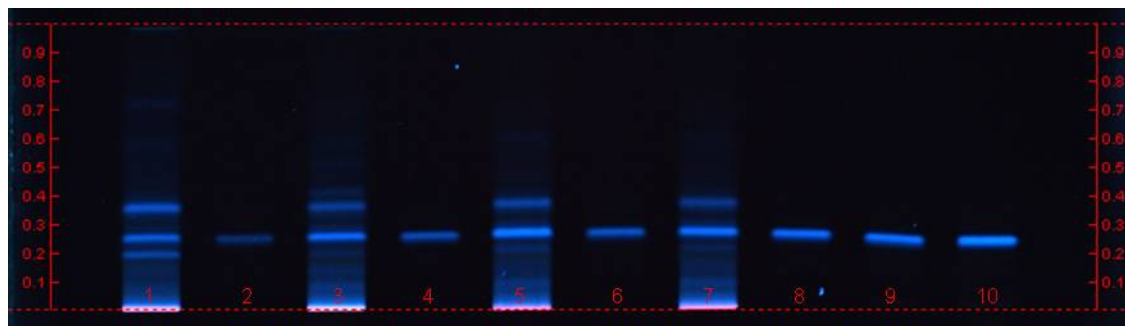
Bahn	Forsythosid A						
	Signal (T=0 min)	Signal (T=5 min)	Signal (T=10 min)	Signal (T=30 min)	Signal (T= 60 min)	Verhältnis T=0/T=30	Verhältnis T=0/T=60
1	1861,94	1813,96	1764,45	1793,12	1768,05	1,04	1,05
2	976,03	928,92	892,09	883,40	861,36	1,10	1,13
3	2671,68	2650,41	2567,19	2621,62	2593,91	1,02	1,03
4	1962,84	1909,52	1847,80	1846,11	1810,33	1,06	1,08
5	4260,63	4205,54	4174,63	4133,26	4231,58	1,03	1,01
6	2417,74	2366,20	2281,40	2276,29	2235,65	1,06	1,08
7	3454,17	3499,68	3405,35	3462,37	3438,83	1,00	1,00
8	3634,78	3556,62	3439,92	3465,96	3408,33	1,05	1,07
9	3945,06	3864,01	3737,88	3793,73	3733,04	1,04	1,06
10	5469,86	5372,21	5223,43	5287,75	5224,61	1,03	1,05

Die detektierten Signalintensitäten (Tab. 85 sowie Abbildungen 85 und 86) sanken innerhalb einer ½ Stunde um ca. 4% und innerhalb 1 Stunde um ca. 5% ab. Die Resultate des Tests zur Prüfung der Stabilität der Ergebnisse konnten damit akzeptiert werden.

3.4.5.1.2 Spezifität

3.4.5.1.2.1 Identifizierung von Forsythiae fructus Proben durch Vergleichen von Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Da für die Untersuchungen keine authentischen Drogenproben vorlagen, wurde die Untersuchung mit allen vorliegenden Forsythiae fructus Proben durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit frisch hergestellten Extrakten und Referenzsubstanzmischungen durchgeführt. Nach Entwickeln und Dokumentieren der Platte mussten die Bande von Forsythosid A und die darunterliegende blaue Bande deutlich getrennt sein.

**Abb. 95: Forsythiae fructus: Vergleich der Extrakte mit Forsythosid A**

Untersuchungslösungen: Bahn 1,3,5,7 Forsythia suspensa fructus Extrakt FfP1-4; Referenzsubstanzlösung Level 1-6: Bahn 2 (0,3 µg; 0,1mg/ml), Bahn 4 (0,46 µg; 0,15mg/ml), Bahn 6 (0,53µg; 0,175 mg/ml), Bahn 8 (0,56 µg; 0,187mg/ml), Bahn 9 (1,2 µg; 0,4 mg/ml), Bahn 10 (1,65 µg; 0,55 mg/ml); Fließmittel Acetonitril/Wasser 20:80 +1% Ameisensäure; Detektion UV 366 nm; Platte: Forsythia_20090317_01_03

Die Auswertung des Bandenmusters bei UV 366 nm zeigte bei den Proben von *Forsythia suspensa* (Bahn: 1, 3, 5, 7) die gleiche Abfolge von Banden. Die Bande des Forsythosid A und die darunterliegende blaue Bande waren deutlich voneinander getrennt (Abb. 95). Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.4.5.1.2.2 Detektion von Verfälschungen

Der Test konnte wegen fehlender Referenzproben nicht durchgeführt werden. Hinweise auf mögliche Verfälschungen konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Eine Verfälschung von *Forsythiae fructus* ist jedoch wegen des geringen Preises der Droge und des spezifischen Aussehens sehr unwahrscheinlich.

3.4.5.1.3 Kalibrierung

3.4.5.1.3.1 Messbereich

Zur Quantifizierung von Forsythosid A in Proben von *Forsythiae fructus* unbekannten Gehalts musste zunächst der Messbereich festgelegt werden.

Vorversuch: Auf eine HPTLC-Platte (Abb. 96) wurden die Untersuchungslösungen und die Referenzsubstanz in bekannter Konzentration aufgetragen. Es wurde angenommen, dass sich das Detektorsignal und die aufgetragenen Proben-/Referenzmengen proportional verhalten.

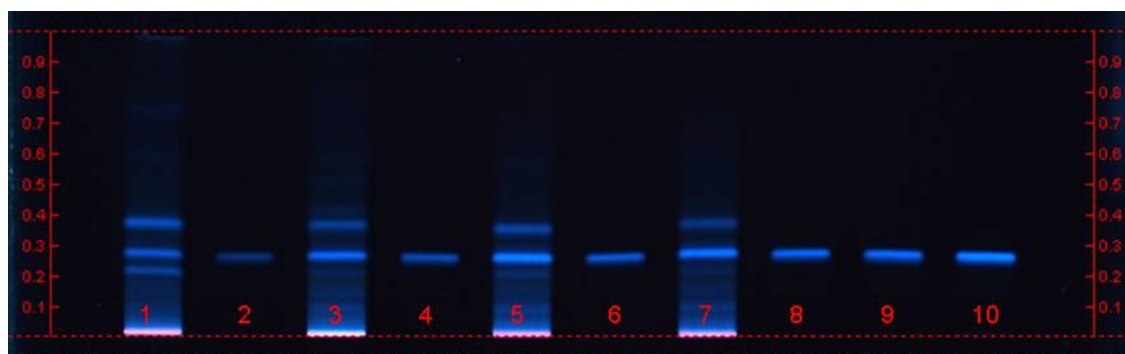


Abb. 96: Vorversuch Messbereich

Untersuchungslösungen: Bahn 1,3,5,7 *Forsythia suspensa* fructus Extrakt FfP1-4; Referenzsubstanzlösung Level 1-6: Bahn 2 (0,3 µg; 0,1mg/ml), Bahn 4 (0,46 µg; 0,15mg/ml), Bahn 6 (0,53µg; 0,175 mg/ml), Bahn 8 (0,56 µg; 0,187mg/ml), Bahn 9 (1,2 µg; 0,4 mg/ml), Bahn 10 (1,65 µg; 0,55 mg/ml); Fließmittel Acetonitril/Wasser 20:80 +1% Ameisensäure; Detektion UV 366 nm; Platte: *Forsythia_20090317_01_01*

Tabelle 86: Ergebniszusammenfassung des Vorversuchs für den Messbereich (Forsythiae fructus)

Bahn	Forsythosid A	
	Fläche [mAU]	Menge [ng]
1 (Extrakt)	1403	-
2 (Level 1)	727	402
3 (Extrakt)	2261	-
4 (Level 2)	1486	732
5 (Extrakt)	3747	-
6 (Level 3)	1942	930
7 (Extrakt)	3074	-
8 (Level 4)	2620	1051
9 (Level 5)	2881	1209
10 (Level 6)	4231	1650

Bedingt durch die vorher durchgeführte Quantifizierung mittels HPLC wurde der Messbereich im Vorversuch schon so gut getroffen, dass eine weitere Anpassung nicht notwendig ist. Die Ergebnisse der Tab. 86 und 87 zeigen, dass der Arbeitsbereich mit den gewählten Konzentrationen abgedeckt ist.

Tabelle 87: Eingesetzte Konzentrations-Level für Forsythosid A

	Konzentrations-					
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
Forsythosid A [µg/ml]	0,134	0,244	0,310	0,350	0,403	0,550

3.4.5.1.3.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des in Kapitel 3.3.5.1.3.1 beschriebenen Kalibriersystems wurde die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür wurden auf einer HPTLC-Platte jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen aufgetragen (Ergebnisse in Tab. 88). Die Berechnung der Varianzen erfolgte mit der Formel 3 (Seite 166).

Tabelle 88: Überprüfung der Varianzhomogenität bei Forsythosid A

Forsythosid A Messung:	Level 1 Peakfläche $y_{i \min}$	Level 6 Peakfläche $y_{i \max}$
1	2149	10437
2	1836	10310
3	1760	9845
4	1664	9486
5	1730	9697
6	1725	10501
Mittelwert [\bar{y}]	1811	10046
Varianz [s^2]	25526	150872
PG	5,91	
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1 , f_2)	10,97	

Die aus den Untersuchungen gewonnenen Prüfgrößen (PG) waren kleiner als der tabellierte Wert in der *F-Wert* Tabelle (P=99%, f_1 , f_2). Es konnte somit von einem gültigen Kalibriersystem im Messbereich ausgegangen werden.

3.4.5.1.4 Wiederholpräzision

Auf Grundlage der Ergebnisse der in Kapitel 3.3.5.1.3 beschriebenen Untersuchungen zur Kalibrierung wurden 3 Untersuchungslösungen je Drogenprobe hergestellt. Auf drei 200x100 mm Platten wurden jeweils eine Untersuchungslösung (4 Proben, á 10 µl) und die Konzentrations-Level (Kalibrierstandards) aufgetragen (á 3 µl). Für die Berechnung der Wiederholpräzision wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet (Tab. 89).

Tabelle 89: Kalibrierfunktionen der Wiederholpräzisionsmessung (Forsythiae fructus)

	Kalibrierfunktion
WP 1, Platte: Forsythia_20090317_01_01	$y=2857x-532$
WP 1, Platte: Forsythia_20090317_01_02	$y=2786x-588$
WP 3, Platte: Forsythia_20090317_01_03	$y=3731x-648$

Tabelle 90: Zusammenfassung der Wiederholpräzisionsergebnisse

FrP1-4=Forsythiae fructus Probe 1-4, WP1-3=Gehalt in mg pro 100 mg Droge der Messungen 1-3 der Wiederholpräzision, MW = Mittelwert der Gehaltberechnung, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Exzelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3

		FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
		Forsythosid A			
WP 1, Platte:	Fläche [mAU]	1367	2233	3627	3077
Forsythia_20090317_01_01	Gehalt [mg/ 100mg]	0,33	0,48	0,72	0,63
WP 2, Platte:	Fläche [mAU]	1322	2061	2565	3154
Forsythia_20090317_01_02	Gehalt [mg/ 100mg]	0,34	0,48	0,56	0,67
WP 3, Platte:	Fläche [mAU]	1861	2671	4261	3454
Forsythia_20090317_01_03	Gehalt [mg/ 100mg]	0,34	0,45	0,66	0,55
	MW [mg/100mg]	0,34	0,47	0,65	0,62
	STABWN [mg/100mg]	0,01	0,02	0,07	0,05
Wiederholpräzision	V_k [%]	1,56	3,44	10,10	8,41

Die Untersuchungen zur Wiederholpräzision lagen innerhalb der geforderten 15% für den Variationskoeffizient (V_k , Tab. 90). Der Test zur Wiederholpräzision konnte akzeptiert werden.

3.4.5.1.5 Laborpräzision

Auf Grundlage der Ergebnisse der Untersuchungen zur Kalibrierung (Punkt 3.4.5.1.3) wurde eine Untersuchungslösung je Drogenprobe hergestellt. Auf 200x100 mm Platten wurde jeweils eine Untersuchungslösung (4 Proben, á 10 µl) und die Konzentrations-Level (Kalibrierstandards, á 3µl) aufgetragen. Dies wurde am darauf folgenden Tag wiederholt. In die Untersuchung wurde die erste Platte der Wiederholpräzision mit einbezogen, so dass sich eine Gesamtzahl von $n = 3$ ergab. Für die Berechnung der Laborpräzision wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet (Tab. 91).

Tabelle 91: Kalibrierfunktionen der Wiederholpräzisionsmessung (Forsythiae fructus)

	Kalibrierfunktion
WP 1/LP 1, Platte: Forsythia_20090317_01_01	$y=2857x-532$
LP 2, Platte: Forsythia_20090317_01_02	$y=2873x-743$
LP 3, Platte: Forsythia_20090317_01_03	$y=1761x-470$

Tabelle 92: Zusammenfassung der Wiederholpräzisionsergebnisse

FrP1-4=Forsythiae fructus Probe 1-4, LP1-3=Gehalt in Prozent der Messung 1-3 der Laborpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Exceelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3

		FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
		Forsythosid A			
WP 1/LP 1, Platte: Forsythia_20090317_01_01	Fläche [mAU] Gehalt [mg/ 100mg]	1367 0,33	2233 0,48	3627 0,73	3077 0,63
LP 2, Platte: Forsythia_20090317_01_02	Fläche [mAU] Gehalt [mg/ 100mg]	1638 0,41	2372 0,54	3168 0,68	3261 0,70
LP 3, Platte: Forsythia_20090317_01_03	Fläche [mAU] Gehalt [mg/ 100mg]	860 0,37	1260 0,49	2269 0,78	1527 0,56
	MW [mg/100mg]	0,37	0,51	0,73	0,63
	STABWN [mg/100mg]	0,03	0,03	0,04	0,05
Wiederholpräzision	V_k [%]	9,15	5,26	5,55	8,56

Die Untersuchungen zur Wiederholpräzision (Tab. 92) lagen innerhalb der geforderten 15% für den Variationskoeffizient (V_k). Die Experimente zur Ermittlung der Wiederholpräzision wurden entsprechend akzeptiert.

3.4.5.1.6 Lineare Regression

Für die Berechnung der linearen Regression wurde für jede Platte und Kalibriersubstanz eine Kalibrierfunktion nach der Formel 4 (Seite 168) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet.

Kalibrierfunktion für Forsythosid A: $y=2802x-596$

3.4.5.1.6.1 Korrelationskoeffizient (r)

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte mit der Formel 30 (Seite 173):

Korrelationskoeffizient für die Kalibrierfunktion von Forsythosid A: 0,982

3.4.5.1.6.2 Reststandardabweichung (s_y)

Die Berechnung der Reststandardabweichung erfolgt mit der Formel 12 (Seite 170)

s_y für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 175,43

3.4.5.1.6.3 Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung erfolgte mit der Formel 13 (Seite 170)

s_{y0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 0,06%

3.4.5.1.6.4 relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der rel. Verfahrensstandardabweichung erfolgte mit Formel 14 (Seite 170).

V_{x0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 6,29%

3.4.5.1.7 Quadratische Regression

Die Berechnungsgrundlage waren alle Kalibrierungen über alle Platten der Präzisionsmessungen. Die Berechnung der quadratischen Regression erfolgte mit der Formel 16 (Seite 171) bis Formel 24 (Seite 172).

Kalibrierfunktion für Forsythosid A: $y = 165,58x^2 + 2460,39x - 445,37$

3.4.5.1.7.1 Reststandardabweichung (s_y)

Die Berechnung der Reststandardabweichung erfolgte mit der Formel 25 (Seite 172).

s_y für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 198,61

3.4.5.1.7.2 Verfahrensstandardabweichung (s_{y0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung erfolgte mit der Formel 26 (Seite 172).

s_{y0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 0,77%

3.4.5.1.7.3 relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der rel. Verfahrensstandardabweichung erfolgte mit der Formel 28 (Seite 172).

V_{x0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 7,15%

3.4.5.1.8 Überprüfung der Varianzen von quadratischer und linearer Regression

Für die Überprüfung wurden die Reststandardabweichungen der linearen und quadratischen Regression miteinander verglichen. Die Prüfgröße wurde mit Formel 29 (Seite 173) berechnet. Die berechnete Prüfgröße (PG) wurde mit dem Wert aus der F-Tabelle mit F (P=99%, f1, f2) verglichen.

PG für Forsythosid A: 1,28

F (P=99%, f1, f2): 10,97

Die Prüfgröße ist kleiner als der tabellierte Wert in der F-Tabelle, so dass der Test akzeptiert werden konnte. Es kann für die Berechnung der Gehalte mit 99%-iger Sicherheit von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden.

3.4.5.1.9 Prognoseintervall und Probeauswertung

Die Berechnungsgrundlage für die Probeauswertung waren alle Kalibrierungen und Probemessungen über alle Platten der Präzisionsmessungen (Tab. 93). Für die Berechnung der Gehalte wurde die in Kapitel 3.3.5.1.6 berechnete Kalibrierfunktion verwendet.

Tabelle 93: Probeauswertung (*Forsythiae fructus*)

FfP1-4=*Forsythiae fructus* Probe 1-4, WP1-3=Gehalt der Wiederholpräzisionsmessung 1-3 in Prozent, LP1-3=Gehalt der Laborpräzisionsmessung 1-3 in Prozent, MW=Mittelwert des Gehaltes, STABWN=Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k =Variationskoeffizient nach Formel 3, n.v.=nicht vorhanden

Präzisionsmessung	Probe			
	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
	Gehalt [%]			
WP1/LP1[%]	0,33	0,48	0,72	0,63
WP2[%]	0,34	0,48	0,56	0,67
WP3[%]	0,34	0,45	0,66	0,55
LP2[%]	0,41	0,54	0,68	0,70
LP3[%]	0,37	0,49	0,78	0,56
MW [%]	0,36	0,49	0,68	0,62
STABWN[%]	0,03	0,03	0,07	0,06
V_k	8,65	6,49	10,50	9,37

Berechnungsgrundlage für die Berechnung des Prognoseintervalls (Tab. 94) waren alle Kalibrierungen und Probenmessungen über alle Platten der Präzisionsmessungen. Die Berechnung des Prognoseintervalls erfolgt mit Formel 32 (Seite 174).

Tabelle 94: Prognoseintervall (*Forsythiae fructus*)

	CaeLo	Compl	Herba	Pharma
Forsythosid A Gehalt [mg/100 mg]	0,358±0,056	0,49±0,053	0,67±0,062	0,62±0,057

3.4.5.1.10 Robustheit

Für die Untersuchung der Robustheit wurde die Laufstrecke variiert. Ausgehend von einer Laufstrecke von 50 mm für die Präzisionsuntersuchungen wurde die Laufstrecke um 5 mm erhöht beziehungsweise um 5 mm verkürzt. Für die Bewertung der Robustheit wurde der Variationskoeffizient aus den Messungen der Laborpräzision 1 und den Messungen der Robustheit aus dem Gehalt der Substanz Forsythosid A berechnet. Das Akzeptanzkriterium wurde mit einem Variationskoeffizient von $\leq 15\%$ festgelegt.

Tabelle 95: Ergebnis der Robustheitsprüfung (Forsythiae fructus)

FfP1-4=Forsythiae fructus Probe 1-4 RP1-2=Gehalt der Robustheitsmessung 1 und 2 in Prozent, LP1=Gehalt der Laborpräzisionsmessung 1 in Prozent, MW=Mittelwert des Gehaltes, STABWN=Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k =Variationskoeffizient nach Formel 3, n.v.=nicht vorhanden

	Probe			
	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
	Gehalt [%]			
LP1[%]	0,39	0,51	0,74	0,55
RP1[%]	0,33	0,48	0,73	0,63
RP2[%]	0,39	0,52	0,76	0,64
MW [%]	0,37	0,50	0,74	0,61
STABWN	0,03	0,01	0,01	0,04
V_k	7,98	2,92	1,52	7,18

Die Untersuchung der Robustheit führte zu Ergebnissen unter 15,0 % und der Test konnte akzeptiert werden.

3.4.5.1.11 Wiederfindungsrate

Zu ca. 2,0 g einer genau eingewogenen Menge pulverisierte Droge von Forsythiae fructus wurde eine bekannte Menge (2,1 mg) von Forsythosid A (in Lösung) zu gegeben und diese Mischung extrahiert. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Aufstockung extrahiert. Auf eine Platte wurde jeweils dreimal der Extrakt mit Aufstockung und der Extrakt ohne Aufstockung aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Kalibrierung mit Forsythosid A vorgenommen, um die Gehalte zu berechnen. Für die Berechnung wurde eine Kalibriergerade aufgestellt. Die Wiederfindung (Tab. 96) berechnet sich nach Formel 34 (Seite 175).

Tabelle 96: Ergebnis der Wiederfindungsuntersuchung

Platten ID: 080722_01_02

	Fläche [mAU] Probe	Fläche [mAU] Aufstockung
1. Messung	6468	7617
2. Messung	6559	7656
3. Messung	6375	7914
MW	6467	7729
Gehalt	0,52%	0,63 %
Gehalt berechnet	-	0,52+0,10% =0,62%
Wiederfindung	-	101,6%

Die Wiederfindungsrate bei Zugabe von Forsythosid A zu einer Pflanzenprobe von Forsythiae fructus lag bei 101,6 %. Der Test auf Wiederfindung konnte akzeptiert werden.

3.4.5.1.12 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenzen wurden nach Formel 15 (Seite 170) berechnet.

Nachweisgrenze für Forsythosid A: 0,2 µg/ml

3.4.5.1.13 Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenzen wurden nach Formel 16 (Seite 171) berechnet.

Quantifizierungsgrenze für Forsythosid A: 0,6 µg/ml

3.4.5.2 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren die Monographie der Ph. VR China Fructus Forsythiae (2005d). Die aufwendige Herstellung der Untersuchungslösung liessen Zweifel an der Reproduzierbarkeit der Methode aufkommen die sich bestätigten. KIRMIZIBEKMEZ (2005) konnte verschiedene Phenylethanoide aus *Phlomis spec.* durch eine Festphasenextraktion aufkonzentrieren und quantifizieren. Im Rahmen von Vorversuchen zu der vorher genannten Methode führte eine einfache Extraktion im Wasserbad unter Rückflusskühlung mit einer neu entwickelten HPLC-Methode zum gewünschten Erfolg.

Die Validierung der Quantifizierung von Forsythosid A mittels HPLC wurde mit einer endcappten RP-18 Säule und einem Gradienten bestehend aus Wasser (A) und Acetonitril (B) mit jeweils 0,1 % Ameisensäure (Eluent B: 0 - 20 Minuten: 17,0% - 22,5%; 20 - 25 Minuten: 22,5% - 90,0%; 25 - 30 Minuten: 90,0% - 17,0%; 30 - 35 Minuten: 17% linear), einem Fluß von 0,6 ml/min, einer Detektorwellenlänge von 325 nm und einem Injektionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Die Untersuchungslösung wurde durch Extraktion von 0,500 g gepulverter (355) Probe mit 100 ml Methanol im Wasserbad unter Rückfluss für 30 Minuten bei 65°C hergestellt, die durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert wurde. Das Filtrat wurde als Testlösung verwendet.

3.4.5.2.1 Stabilität der Analyten in Lösung

Die Lösung einer authentischen Drogenprobe wurde wie in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben extrahiert und unter den beschriebenen Bedingungen in ein HPLC-System eingespritzt. Die Probe wurde wiederholt in das System eingespritzt und die Chromatogramme der einzelnen Läufe ausgewertet. Der Variationskoeffizient der Peakflächen des Forsythosid A durfte nicht mehr als 6% betragen. Die Probe ist mindestens 3 Stunden in Lösung stabil, wenn der Variationskoeffizient der Peakfläche von Forsythosid A des Extrakts nicht größer als 6% ist.

Tabelle 97: Stabilität der Analyten in Lösung

MW = Mittelwert der Messung 1 – 16, STABWN = Excelfunktion für die Standardabweichung, V_k = Variationskoeffizient berechnet nach Formel 3, Analysenzeit je Messung 35 Minuten

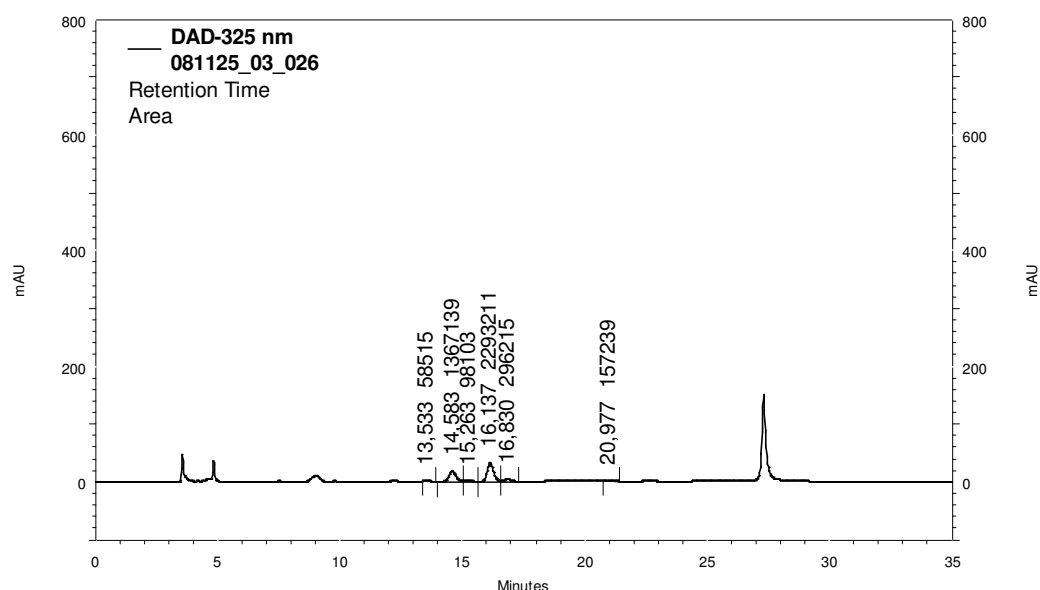
Messung	Fläche [mAU]	Messung	Fläche [mAU]
1	2391069	10	2309936
2	2378202	11	2339983
3	2404837	12	2324360
4	2376907	13	2344252
5	2376610	14	2293810
6	2366858	15	2285664
7	2377560	16	2293211
8	2367349	MW	2348863
9	2351206	STABWN	36370
		V_k	1,55

Die Analysenzeit je Messung beträgt 47 Minuten (in der Tabelle steht 35 Minuten). Der Variationskoeffizient (V_k) lag bei wiederholter Messung der gleichen Probe über einen Zeitraum von 9,3 Stunden unter den geforderten 6% (Tab. 97).

Der Test für die Stabilität des Analyten in Lösung konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.2 Spezifität

Die Methode für die Quantifizierung von Forsythosid A in Forsythia fructus wurde als spezifisch angesehen, wenn der Peak von Forsythosid A und der folgende Peak (Rutin) vorhanden waren.

**Abb. 97: Spezifität der Methode**

Peak bei 16,1 min: Forsythosid A; Peak bei 16,8 min: Rutin

Die Peaks von Forsythosid A und Rutin waren im Chromatogramm vorhanden (Abb. 97). Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.3 Kalibrierung

3.4.5.2.3.1 Messbereich (Range)

Zur Quantifizierung von Forsythosid A in den Proben von Forsythiae fructus unbekannten Gehalts musste zunächst der Messbereich festgelegt werden.

Die Pflanzenproben wurden wie in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben extrahiert und chromatographiert. Zusätzlich wurden Verdünnungen der Referenzsubstanz hergestellt und unter den selben Bedingungen chromatographiert. Es wurde angenommen, dass sich das Detektorsignal und die eingespritzten Referenzlösungen proportional zum Detektorsignal verhalten.

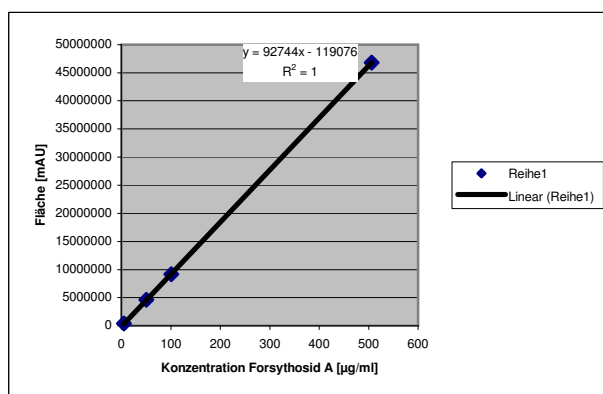


Abb. 98: Kalibriergerade Vorversuch Forsythosid A (HPLC)

Tabelle 98: Vorversuch Forsythosid A (HPLC)

Konzentrationen (Forsythosid A) [µg/ml]:	Detektorsignal [mAU]:
0,506	Nicht messbar
5,06	424635
50,6	4591307
101,2	9154733
506	46829096

Kalibrierung

Tabelle 99: Vorversuch Forsythosid A in Proben

FfP1-4 = Forsythiae fructus Probe 1-4

	Proben			
	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
Signalfäche [mAU]	1414397	1860956	2639315	2094003

Der Mittelwert des Detektorsignals der Substanz Forsythosid A in den unbekannten Proben wurde als „Mitte“ des Messbereichs festgelegt (Tab. 99). Der Messbereich wurde als: „Mitte“ \pm 50 % festgelegt. Es wurden entsprechende 6 verschiedene (äquidistant) Konzentrationen der Kalibrierlösung (Level 1-6) hergestellt (Tab. 100).

Aus der Kurve der Vorkalibrierung (Abb. 98, Tab. 98) war ersichtlich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Forsythosid A und dem Detektorsignal vorhanden ist.

Der Messbereich wurde zwischen den Konzentrationen 5,06 µg/ml und 38,6 µg/ml mit jeweils 3 µl Auftragevolumen festgelegt.

Tabelle 100: Konzentrationen der Kalibrierlösungen von Forsythosid A (HPLC)

	Konzentrationen [µg/ml]					
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
Forsythosid A	5,06	11,78	18,50	25,19	32,76	38,60

3.4.5.2.3.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des entwickelten Kalibriersystems (3.3.5.2.3.1) wurde die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür wurden jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen chromatographiert (Tab. 101). Die Berechnung der Varianzen erfolgte mit Formel 1 (Seite 166).

Tabelle 101: Varianzhomogenität Forsythosid A (HPLC)

Forsythosid A Messung:	Level 1 Peakfläche y_i min	Level 6 Peakfläche y_i max
1	393411	2660881
2	390230	2670840
3	398014	2672529
4	386681	2678670
5	396134	2649280
6	400337	2640728
Mittelwert \bar{y}	394134,5	2662154,7
Varianz s^2	21473794	180383226
PG	8,40	
Wert F-Tabelle F (P=99 %, f_1 , f_2)	10,97	

Die Prüfgröße wurde dann mit Formel 2 (Seite 167) berechnet. Der Wert aus der F-Tabelle ist mit F (P=99%, f_1, f_2) zu entnehmen und mit der Prüfgröße PG zu vergleichen. Es ergab sich für die Prüfgröße PG ein Wert kleiner als der F-Wert, der Varianzunterschied ist nicht signifikant, die Varianzen homogen und der Arbeitsbereich musste nicht angepasst werden. Der Test konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.3.3 Kalibrierfunktion

Aus den Vorversuchsexperimenten wurden die Konzentrationen für die 6 Konzentrationen der Kalibrierfunktion berechnet und aus einer Stammlösung die Verdünnungen für die Lösungen der Kalibrierfunktion hergestellt. Die einzelnen Konzentrationen wurden dreimal chromatographiert und ausgewertet (Tab. 102).

Tabelle 102: Kalibrierwertetabelle Forsythosid A (HPLC)

Forsythosid A (Level)	1	2	3	4	5	6
Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	5,06	11,78	18,50	25,18	32,76	38,60
Messung 1 [mAU]	382463	847548	1412686	1956725	2464288	2822052
Messung 2 [mAU]	382940	858980	1407404	1953402	2460126	2786856
Messung 3 [mAU]	377403	842913	1403996	1933516	2441184	2774003
MW	380935	849814	1408029	1947881	2455199	2794304
STABWN	2505	6752	3575	10248	10055	20311
Vk	0,66	0,79	0,25	0,53	0,41	0,73

3.4.5.2.3.3.1 Kalibriergerade

Für die Berechnung der Kalibriergeraden (Abb. 99) wurden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wurde eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Diese Gerade wird durch folgende Formel 4 (Seite 168) beschrieben. Für die Berechnung der Kalibriergerade wurden die Parameter m und b mit der Formel 5 (Seite 166) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet.

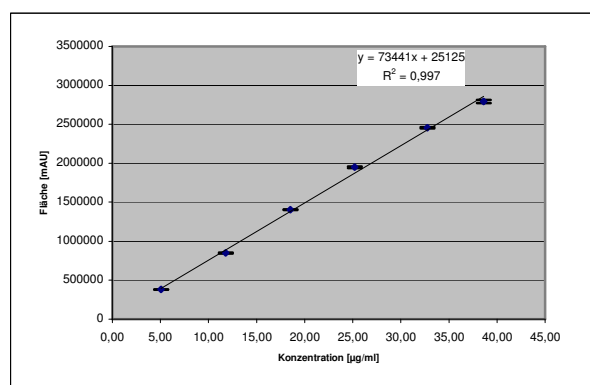


Abb. 99: Kalibriergerade Forsythosid A (HPLC)

3.4.5.2.3.3.2 Reststandardabweichung (s_y)

Die Präzision der Kalibriergeraden wird mit der Reststandardabweichung s_y ausgedrückt. Die Berechnung erfolgte mit Formel 13 (Seite 170).

s_y für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 56501

3.4.5.2.3.3 Verfahrensstandardabweichung (s_{x0})

Aus der Reststandardabweichung s_y und der Steigung m der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit E) errechnet sich die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} mit der Formel 14 (Seiten 170)

s_{x0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 1,6%

3.4.5.2.3.4 Relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Bei der rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird ausgehend von der Verfahrensstandardabweichung Bezug auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} genommen. Berechnet wird die rel. Verfahrensstandardabweichung mit Formel 15 (Seite 170).

V_{x0} für die Kalibriergerade von Forsythosid A: 3,50%

3.4.5.2.4 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve wurden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wurde eine polynomische Kurve berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Mit der allgemeinen Funktionsgleichung einer Parabel kann eine quadratische Regression (Abb. 100) erfolgen, Formel 16 (Seite 171). Mit den drei Parametern n , m und b kann eine quadratische Funktion zur Berechnung der Konzentrationen erstellt werden. Mit Formel 17 (Seite 171) bis Formel 24 (Seite 172) kann die Funktionsgleichung aufgestellt werden.

Kalibrierfunktion für Forsythosid A: $y = -308x^2 + 86939x - 81634$

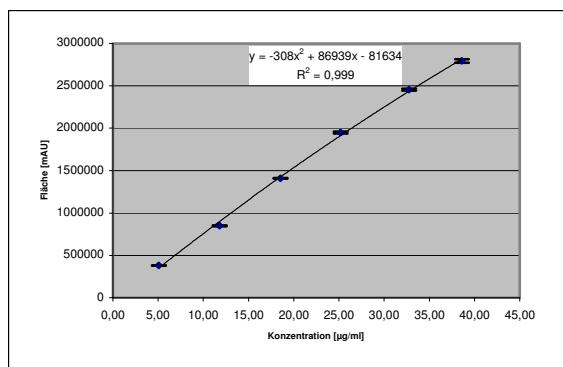


Abb. 100: Quadratische Regression Forsythosid A (HPLC)

3.4.5.2.4.1 Reststandardabweichung (s_y)

Die Reststandardabweichung berechnet sich nach Formel 25 (Seite 172).

s_y für die quadratische Regression von Forsythosid A: 2318810

3.4.5.2.4.2 Verfahrensstandardabweichung (s_{x0})

Die Verfahrensstandardabweichung berechnet sich nach Formel 26 (Seite 172)

s_{x0} für die quadratische Regression von Forsythosid A: 31,6

3.4.5.2.4.3 Relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0})

Die Berechnung der Verfahrensstandardabweichung erfolgt mit Formel 28 (Seite 172).

V_{x0} für die quadratische Regression von Forsythosid A: 143,7

3.4.5.2.5 Überprüfung der Varianzen von quadratischer und linearer Regression

Ein Anpassungstest nach Mandel für die quadratischen und linearen Regressionskurven entfiel für die Kalibrierkurven von Forsythosid A, da die Verfahrensstandardabweichungen der linearen Regression kleiner waren als die der quadratischen und somit die lineare Regression akzeptiert werden konnte.

3.4.5.2.6 Wiederholpräzision

Es wurden wie unter 3.3.5.2 beschrieben drei Untersuchungslösungen unabhängig von einander hergestellt und unter denselben Bedingungen chromatographiert. Die Wiederholpräzision der Methode wurde akzeptiert, wenn der Variationskoeffizient (V_k) des Gehalts $\leq 5\%$ war. Die Berechnung des V_k erfolgte mit Formel 4 (Seite 168)

Tabelle 103: Zusammenfassung der Wiederholpräzisionsergebnisse

FfP1-4 = Forsythiae fructus Probe 1-4, WP1-3=Gehalt in Prozent der Messung 1-3 der Wiederholpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Exceelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
Forsythosid A	WP1	1430012	1896511	2465482	2053463
Fläche [mAU]	WP2	1351455	1772357	2354653	1998197
	WP3	1308199	1751489	2299672	2023425
Gehalt [%]	WP1[%]	0,38	0,50	0,66	0,56
	WP2[%]	0,36	0,48	0,62	0,53
	WP3[%]	0,35	0,47	0,62	0,53
Wiederholpräzision	MW [%]	0,36	0,48	0,63	0,54
	STABWN[%]	0,01	0,01	0,02	0,01
	V_k [%]	3,07	2,48	2,85	2,26

Die Auswertung der Wiederholpräzision (Tab. 103) zeigte für die Proben Ergebnisse unter 5,0 % relativer Standardabweichung und der Test konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.7 Laborpräzision

Das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Experiment wurde mit jeweils einer Untersuchungslösung an 2 weiteren Tagen wiederholt. Kriterium für die Akzeptanz des Tests war ein Variationskoeffizient (V_k) $\leq 5\%$.

Tabelle 104: Zusammenfassung der Laborpräzisionsergebnisse

FfP1-4=Forsythiae fructus Probe 1-4, LP1-3=Gehalt in Prozent der Messung 1-3 der Laborpräzision, MW = Mittelwert des Gehaltes, STABWN = Standardabweichung berechnet nach der Excelfunktion STABWN, V_k = Variationskoeffizient nach Formel 3 (Seite 168)

		FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
Forsythosid A Fläche [mAU]	LP1	1430012	1896511	2465482	2053463
	LP2	1414397	1860956	2639315	2094003
	LP3	1286437	1896358	2358357	1943679
Gehalt [%]	LP1[%]	0,38	0,50	0,66	0,56
	LP2[%]	0,37	0,50	0,68	0,56
	LP3[%]	0,34	0,50	0,63	0,53
Laborpräzision	MW [%]	0,36	0,50	0,66	0,55
	STABWN[%]	0,02	0,002	0,02	0,01
	V_k [%]	4,49	0,38	3,15	1,92

Die Untersuchung der Laborpräzision führte zu Ergebnissen unter 5,0% (Tab. 104), der Test kann akzeptiert werden.

3.4.5.2.8 Probenauswertung und Prognoseintervall

Mit den Kalibrierfunktion kann die Konzentration der Substanz Forsythosid A in den unbekannten Proben abgeschätzt werden (Tab. 105). Die Kalibrierfunktion Formel 3 (Seite 168) wurde nach x umgestellt und die Probenabschätzung durchgeführt. Der Mittelwert wurde aus den Untersuchungen der Laborpräzision und Wiederholpräzisionsuntersuchungen gemittelt, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden auf den Mittelwert der fünf Präzisionsmessungen bezogen.

Tabelle 105: Probeauswertung Forsythosid A (HPLC)

Forsythosid A	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
Mittelwert Gehalt [%]	0,36	0,49	0,644	0,54
Standardabweichung [%]	0,01	0,01	0,02	0,01
Variationskoeffizient [%]	3,63	2,66	3,72	2,23

Für die statistische Bewertung des Gesamtfehlers aus Kalibrierung und Messung der Proben wurde eine Berechnung angestellt (Tab. 106). Da sich die Fehler aufsummieren und fortpflanzen, liegt die „wahre“ (jedoch unbekannte) Gerade zwischen zwei Hyperbeln. Das Wertepaar auf beiden Hyperbeln wurde mit Formel 32 (Seite 174) berechnet.

Tabelle 106: Prognoseintervall für den Gehalt an Forsythosid A (HPLC)

	FfP1	FfP2	FfP3	FfP4
Prognoseintervall Gehalt Forsythosid A [µg/ml Untersuchungslösung]	17,9±1,3	24,4±1,3	32,2±1,5	27,1±1,4

3.4.5.2.9 Robustheit

Für die Untersuchung der Robustheit wurde eine Probelösung wie unter Kapitel 3.3.5.2 beschrieben hergestellt und mit Ausnahme der Säurekonzentration in den Eluenten unter den selben Bedingungen chromatographiert. Die Säurekonzentration der beiden Eluenten wurde jeweils auf 1,5% erhöht. Die Probe wurde dreimal vermessen. Der gemittelte Gehalt der berechneten Probe aus diesem Versuch durfte eine prozentuale Abweichung bezogen auf den berechneten Gehalt unter Punkt 3.3.5.2.8 Probenauswertung und Prognoseintervall von $\pm 5\%$ nicht übersteigen.

Tabelle 107: Ergebnis Robustheitsuntersuchung Forsythosid A (HPLC)

	[%]
MW Robustheitsuntersuchung (Forsythosid A Gehalt)	0,642
MW Probeauswertung (Forsythosid A Gehalt)	0,644
Abweichung bezogen auf MW Probeauswertung	0,28

Die vermessene Probe lag innerhalb der geforderten Grenze. Der Test konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.10 Wiederfindungsrate

Zu 498,8 mg einer genau eingewogenen Menge pulverisierter Droge von Forsythiae fructus wurde eine bekannte Menge (0,59 mg) von Forsythosid A (in Lösung) zu gegeben, diese Mischung wurde wie unter 3.3.5.2 beschrieben extrahiert und chromatographiert. Die Wiederfindung berechnet sich nach Formel 34 (Seite 175).

Tabelle 108: Wiederfindungsrate

Menge berechnet [mg]	Menge gemessen [mg]	Wiederfindungsrate
1,80 + 0,59 = 2,39	2,54	106,3%

Die Wiederfindungsrate lag bei 106,3% (Tab. 108) und konnte akzeptiert werden.

3.4.5.2.11 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze berechnet sich nach Formel 35 (Seite 175).

Nachweisgrenze für Forsythosid A: 2,5 µg/ml

3.4.5.2.12 Bestimmungsgrenze

Quantifizierungsgrenze für Forsythosid A: 7,69 µg/ml

3.5 Leonuri herba

Chinesisches Mutterkraut enthält die getrockneten oberirdischen Teile von *Leonurus japonicus* Houtt. (Lamiaceae). Die Droge wird zu Beginn oder vor der Blüte geerntet und getrocknet. Gehalt: mindestens 0,3 Prozent Flavonoide, berechnet als Hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4) bezogen auf die getrocknete Droge.

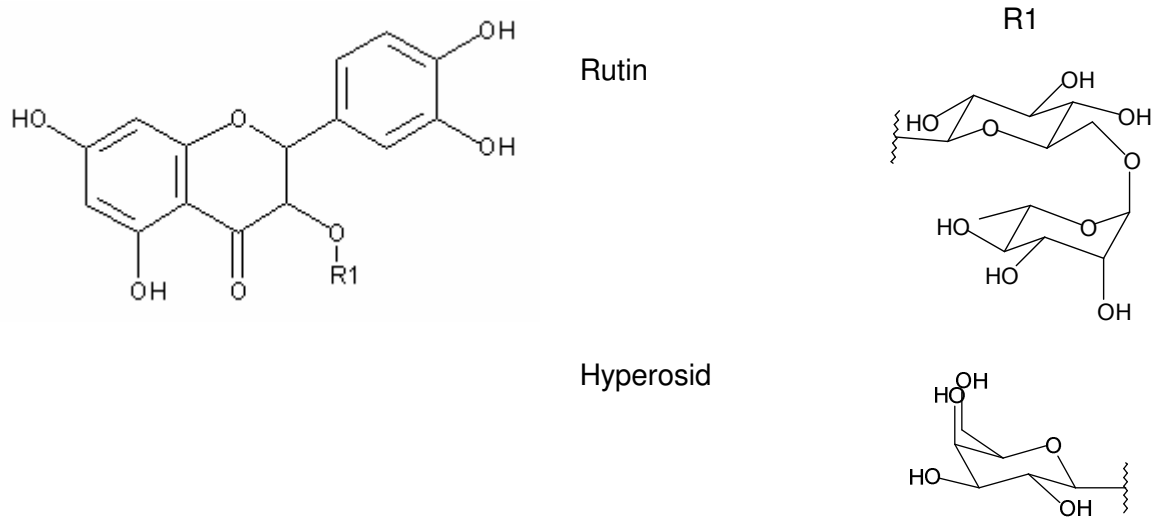


Abb.: 101: Hyperosid und Rutin

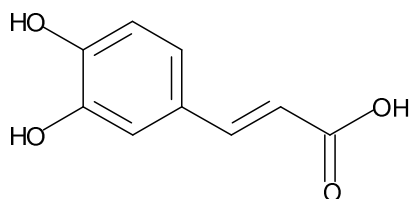


Abb.: 102: Kaffeesäure

3.5.1 Prüfung auf Identität

3.5.1.1 Makroskopische Prüfung

Das Kraut enthielt grün-gräuliche, widerstandsfähige und ausgeprägt vierkantige Stängel mit einem Durchmesser von ca. 2 - 10 mm. Vor allem bei dickeren Stengelteilstücken war im Zentrum weißes Mark erkennbar. Die Stängel waren senkrecht gefurcht. Jüngere Triebe waren deutlich dünner im Durchmesser und oft verzweigt. Die Blätter waren graugrün und zerknittert, sie zerfallen leicht in kleinere Fragmente. Die achsenständigen Blütenstände wiesen blassviolett gefärbte Blüten mit einem röhrenförmigen Kelch und zweilippiger Korolla auf.



Abb. 103: Leonuri herba Übersicht

3.5.1.2 Mikroskopische Prüfung

Die Droge wurde pulverisiert (355). Das Pulver war grau-grün. Die Prüfung erfolgte unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat Lösung R verwendet wurde. Das Pulver zeigte folgende Merkmale:

Fein behaarte Epidermiszellen mit Cuticula (Abb. 102), Drüsenschuppen mit 4-, 6- oder 8-zelligem Köpfchen (Abb. 103, 0,05 -0,10 mm Durchmesser), einer Stielzelle und 1- 4 zellige Haare (Abb.104) mit einer Länge von 0,15- 0,30 mm. Hypodermale kollenchymatische Zellen, die reichlich im kantigen Mark vorhanden sind. Der Cortex besteht aus mehreren Lagen Parenchymzellen mit winzigen Calciumoxalatkristallen und kleinen Prismen, die deutlich abgrenzbar von der Epidermis sind. Leicht lignifizierte Faserbündel waren ebenfalls erkennbar.



Abb. 104: Cuticulafragment
mehrzellige Haare

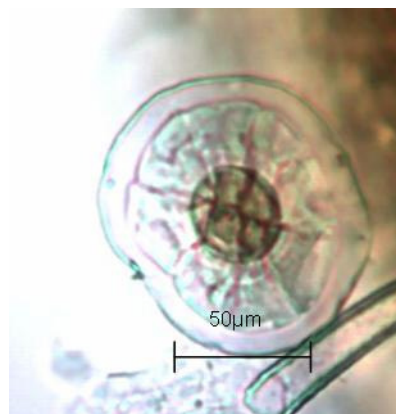


Abb. 105: Drüsenschuppe
Drüsenschuppe mit 8 - zelligem Köpfchen

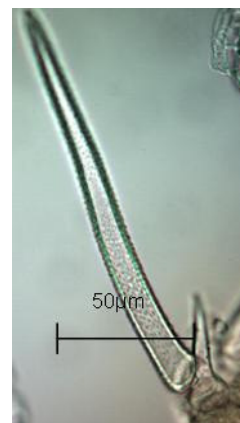


Abb. 106: Einzelliges Haar

3.5.1.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

In der Monographie Herba Leonuri der Ph.VR China wird die Droge aufwendig aufgearbeitet, um die Substanz Stachydrin zu konzentrieren. Im Anschluß wird durch den Nachweis des Stachydrins die Identität von *Leonurus japonicus* mittels Dünnschichtchromatographie bestätigt. Eine Unterscheidung von der nahe verwandten Spezies *Leonurus cardiaca* ist mit dieser Methode aber nicht möglich, da bei gleicher Methode für Aufarbeitung und anschließender Trennung mittels Dünnschichtchromatographie die Chromatogramme fast identisch sind. Für die Identitätsprüfung ist bei Krautdrogen die Überprüfung des Flavonoidmusters nahe liegender und auch hier gelang damit eine eindeutige Unterscheidung der beiden oben genannten Spezies.

Entsprechend wurde zur Validierung der Identitätsprüfung ein Fingerprintchromatogramm des Flavonoidmusters verwendet. Es erfolgte eine 10 minütige Extraktion von 1 g gepulverter Droge mit 100 ml Methanol bei 65°C unter Rückflusskühlung. Nach der Entwicklung des filtrierten Extrakts auf Kieselgel mit wasserfreier Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75) erfolgte eine Derivatisierung mit Naturstoffreagenz/Macrogol. Danach wurde bei 110°C getrocknet. Die Auswertung erfolgte im UV-Licht bei 366 nm.

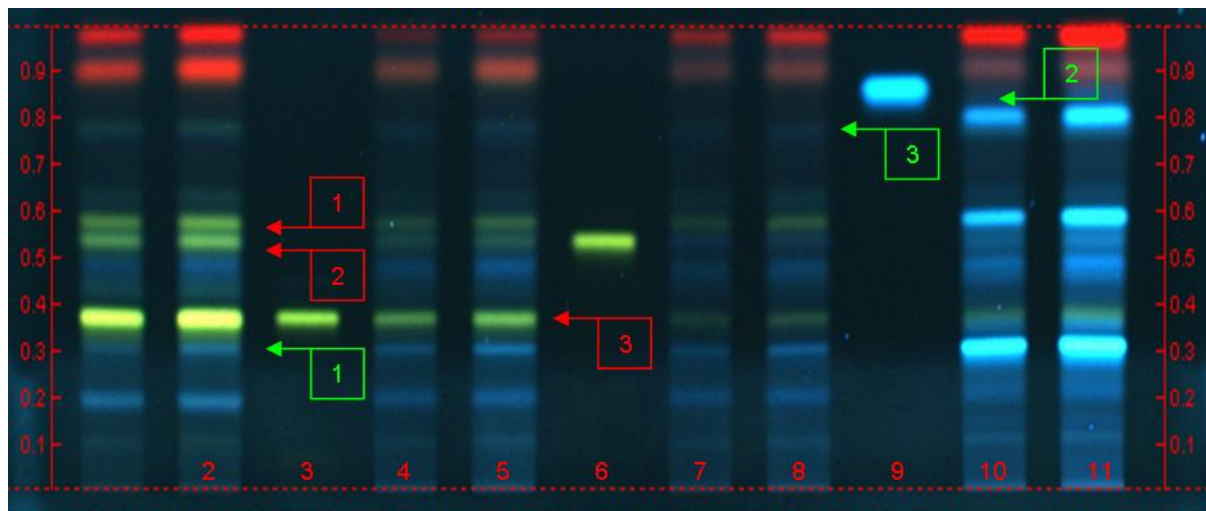


Abb. 107: Flavonoidmuster *Leonurus japonicus* (Herba)

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus cardiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1 mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2 µl; 1 mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3 µl; 1 mg/ml)

Bei der Auswertung des Chromatogramms (Abb. 107) im UV-Licht bei 366 nm erschienen Rutin (Bahn 3) und Hyperosid (Bahn 6) als gelbe Banden und waren in den Drogenextrakten von *Leonurus japonicus* eindeutig zu identifizieren. Um *Leonurus japonicus* eindeutig identifizieren zu können, muss die Rutinbande (roter Pfeil 3 in Abb. 107) vorhanden sein während die Hyperosid-Bande (roter Pfeil 2 in Abb. 107) je nach Anbieter nur schwach erkennbar war. Über der Bande des Hyperosids musste eine weitere gelbe Bande erkennbar sein (roter Pfeil 1 in Abb. 107). Kurz unterhalb der Rutin-Bande kann eine

blaufluoreszierende Bande (grüner Pfeil 1 in Abb. 107) liegen, die aber nicht intensiver leuchten darf als die Rutin-Bande. Über der Hyperosid-Bande darf keine deutlich intensive blaue Bande liegen. Außerdem darf keine Kaffeesäure-Bande vorhanden sein. Unterhalb der Kaffeesäure-Bande darf eine blaufluoreszierende Bande (grüner Pfeil 3) liegen, die aber nicht deutlich stärker fluoresziert als die Bande der Kaffeesäure.

3.5.1.3.1 Stabilität während der Chromatographie

Zur Überprüfung der Stabilität der Analyten während der Chromatographie wurde der Extrakt punktförmig am Plattenrand aufgetragen, ein Mal entwickelt. Die Platte wurde getrocknet um 90° gedreht und ein zweites Mal entwickelt. Die Analyten der Untersuchungslösung lagen in dem erhaltenen Chromatogramm auf der Winkelhalbierenden und es zeigten sich keine Abbauprodukte (Abb. 108). Die Stabilität der Analyten während der Chromatographie war somit gezeigt.

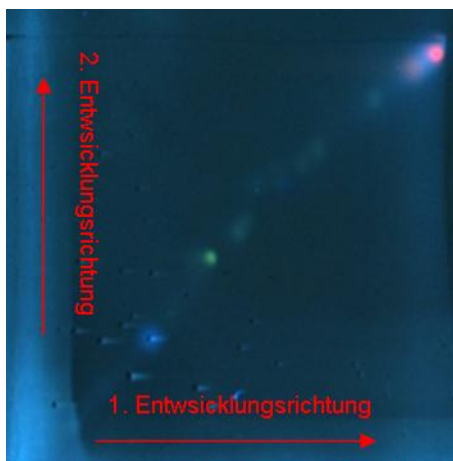


Abb. 108: 2-D Entwicklung

1 µl Leonuri herba Extrakt punktförmig aufgetragen und 2-mal entwickelt. Nach der 1. Entwicklung wurde die Platte getrocknet, um 90° gedreht und ein 2-weiteres mal entwickelt, Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Bild nach Derivatisierung mit NR/PEG bei UV 366 nm Platte: Leo_20081121_03

Während der Chromatographie zeigten sich keine Veränderungen (Abb. 108). Der Test konnte akzeptiert werden.

3.5.1.3.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Für diese Prüfung wurden zwei Extrakte im Abstand von zwei Stunden hergestellt. Ein Aliquot des ersten Extraktes wurde sofort auf die Platte aufgetragen. Die verbleibende Lösung wurde verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Eine zweite Lösung wurde bis zum Ablauf der zwei Stunden hergestellt. Diese Lösung wurde sofort zweimal auf die Platte aufgetragen. Als vierte Bande wurde im Anschluss die Lösung aufgetragen, die zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war.

Nach Entwickeln, Derivatisieren und Dokumentieren der Platte dürften sich bei visueller Auswertung der einzelnen Bahnen auf der Platte keine Unterschiede der Farben und Farbintensitäten der einzelnen Banden ergeben. Der Fingerprint der einzelnen Bahnen musste identisch sein.

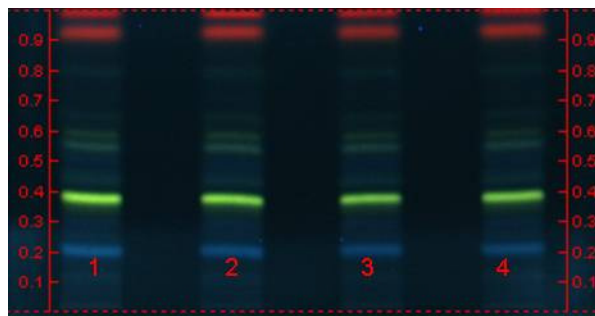


Abb. 109: Stabilität Platte/Lösung

Bahn 1: Leonuri herba Extrakt 2 h auf der Platte
 Bahn 2: Leonuri herba Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 3: Leonuri herba Extrakt frisch aufgetragen
 Bahn 4: Leonuri herba Extrakt 2 h in Lösung
 Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), jeweils 10 µl, Bild nach Derivatisierung mit NR/PEG bei UV 366 nm; Platte: Leo_20081121_04

Die Auswertung der Chromatogramme (Abb. 109) ergab keinen Unterschied im Fingerprint der aufgetragenen Extrakte. Eine Auswertung ist unter den beschriebenen Bedingungen ohne Probleme möglich.

Der Test für die Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte konnte akzeptiert werden.

3.5.1.3.3 Stabilität der Derivatisierung

Für die Beurteilung der Stabilität der Derivatisierung nach Entwickeln der Platte wurde jeweils nach 5 Minuten (Abb. 110) und nach 30 Minuten (Abb. 111) ein Bild bei 366 nm und bei Tageslicht gemacht. Die Stabilität wurde akzeptiert wenn eine Auswertung nach 30 Minuten möglich war ohne das starke Veränderungen der Farben und Farbintensität auftraten.

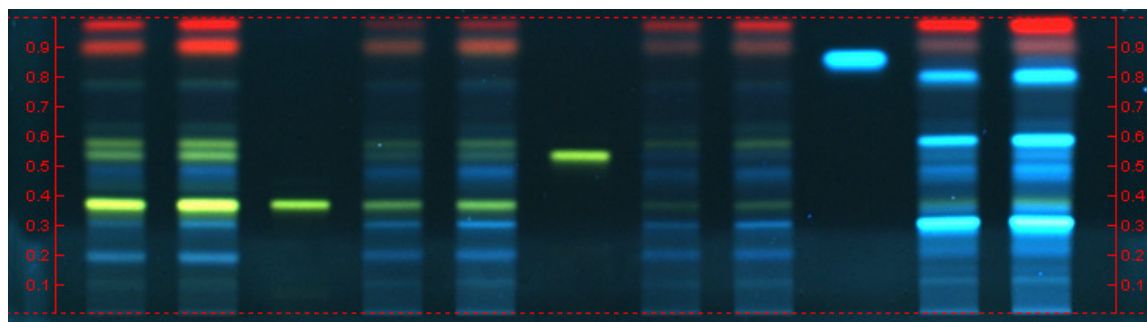


Abb. 110: Stabilität der Derivatisierung von Leonuri herba Extrakt nach 5 min

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus caridiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme 5 Minuten nach der Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Platte: Leo_20081124_01_02

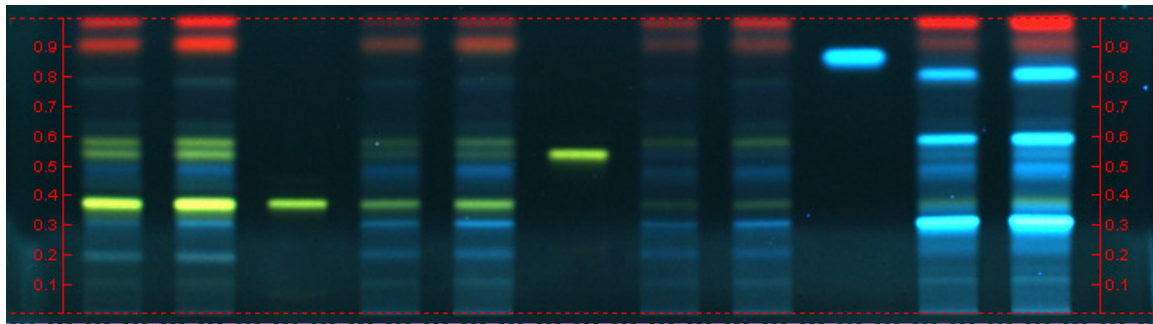


Abb. 111: Stabilität der Derivatisierung von Leonuri herba Extrakt nach 60 min

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus cardiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme 30 Minuten nach der Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Platte: Leo_20081124_01_02

Während der festgelegten Zeit von 30 Minuten ergaben sich keine starken Veränderungen der Derivatisierung, die Auswertung des Chromatogramms konnte ohne Einschränkung erfolgen. Der Test auf Stabilität der Derivatisierung wurde akzeptiert.

3.5.1.3.4 Spezifität

3.5.1.3.4.1 Identifizierung von Leonuri herba Proben durch Vergleich mit authentischer Drogenprobe und Referenzsubstanzen

Für die Durchführung des Spezifitätstests konnte authentisches (botanisch eindeutig identifizierte Probe) Drogenmaterial der „Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft“ (LfL) erhalten werden. Dieses Material wurde mit den kommerziell erhältlichen Proben verglichen. Die Untersuchung für die Identitätsprüfung wurde wie in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben durchgeführt. Der Test wurde akzeptiert, wenn der Fingerprint der handelsüblichen Drogen mit der Probe der LfL übereinstimmte und deutlich von dem Fingerprint der Droge *Leonurus cardiaca* zu unterscheiden ist.

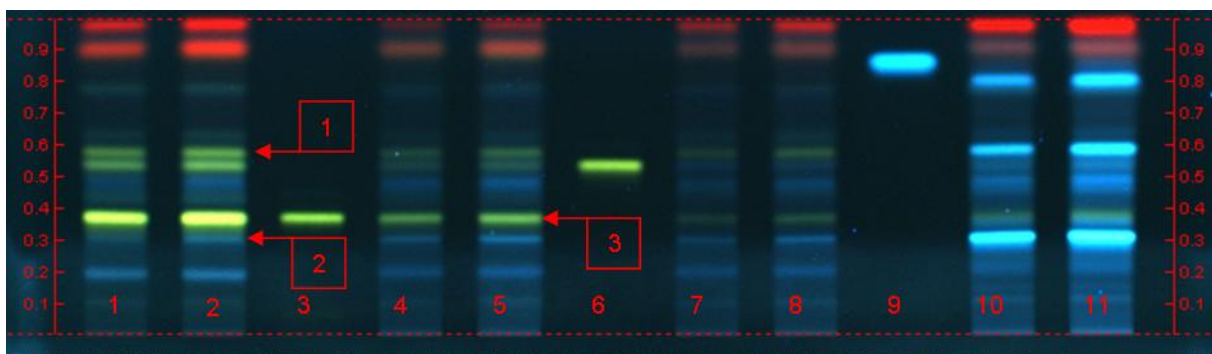


Abb. 112: Spezifitätsuntersuchung (UV 366 nm), Leonuri herba

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus cardiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme 30 Minuten nach der Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Platte: Leo_20081124_01_01

Die Auswertung des Bandenmusters nach Derivatisierung bei UV 366 nm ergab bei allen drei Drogenextrakten die selbe Abfolge im Fingerprint. Lediglich bei der Probe auf den Bahnen 7 und 8 war die Bande des Hyperosids nicht erkennbar, die Abfolge der restlichen Banden war aber identisch und deutlich unterschiedlich zu den Proben der Spezies *Leonurus cardiaca* (Abb. 112). Der Test für die Spezifität konnte akzeptiert werden.

3.5.1.3.4.2 Detektion von Verfälschungen

Eine Verfälschung der Droge Leonuri herba ist wegen des geringen Preises der Droge nicht zu erwarten. Um die eine Unterscheidung zu der bereits im Europäischen Arzneibuch monographierten Droge *Leonurus cardiaca* treffen zu können, wurde der Test auf Verfälschung mit dieser Spezies durchgeführt.

Die Chromatogramme der Extrakte von *Leonurus cardiaca* in Abb. 112 sind auf Bahn 10 und 11 aufgetragen getrogen worden. Es konnten deutlich drei intensiv blau fluoreszierende Banden identifiziert werden. Die gelb fluoreszierende Bande des Rutins war nur sehr schwach sichtbar, die ebenfalls gelb fluoreszierenden Banden des Hyperosid und der Bande über dem Hyperosid waren nicht vorhanden. Mit der vorgeschlagenen Methode war deshalb eine Aufdeckung einer Verfälschung der Droge *Leonurus japonicus* mit *Leonurus cardiaca* möglich. Der Test konnte akzeptiert werden.

3.5.1.3.5 Wiederholpräzision

Für die Untersuchung der Wiederholpräzision wurden an einem Tag drei Chromatogramme unabhängig von einander entwickelt. Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit Naturstoffreagenz und Macrogol 400-Lösung derivatisiert, erhitzt, bei 366 nm die Dokumentation durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Identität identisch waren und die Banden auf der Platte parallel ohne Kurven oder Wellen verliefen. Die R_F -Werte der vorher spezifizierten Banden durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,03 R_F -Werteinheiten von einander abweichen.

Tabelle 109: Wiederholpräzision

Für die repräsentativen Banden ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,03 R_F -Werteinheiten, *Leonurus japonicus* Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus caridiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75) Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm

	Plattenbezeichnung			
	Leo 20081124 01 02	Leo 20081124 01 03	Leo 20081124 01 04	
Bande	R_F			ΔR_F
Kaffeesäure	0,86	0,85	0,86	0,01
gelbe Bande über Hyperosid	0,60	0,58	0,58	0,02
Hyperosid	0,54	0,53	0,54	0,01
Rutin	0,37	0,37	0,39	0,02
blaue Bande unter Rutin	0,20	0,21	0,20	0,01

Die Ergebnisse der Wiederholpräzision (Tab. 109) lagen innerhalb der geforderten Grenzen. Nach Auswertung der dokumentierten Platten konnte die Untersuchung der Wiederholpräzision akzeptiert werden.

3.5.1.3.6 Laborpräzision

Zur Überprüfung der Laborpräzision wurde an drei aufeinander folgenden Tagen ein Chromatogramm entwickelt. Die Untersuchungslösungen wurden für jedes Chromatogramm neu extrahiert und auf eine Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte für jede Platte mit frischem Fließmittel. Nach der Trocknung wurde mit NR/Macrogol derivatisiert, erhitzt und die Dokumentation durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden akzeptiert, wenn alle Banden für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Identität identisch waren. Die Banden sollten auf der Platte ohne Kurven oder Wellen parallel verlaufen. Die R_F -Werte der vorher spezifizierten Banden durften auf den drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_F -Werteinheiten von einander abweichen.

Tabelle 110: Laborpräzision

Für die repräsentativen Banden ergeben sich nach der Auswertung keine Abweichungen von größer 0,06 R_F -Werteinheiten, *Leonurus japonicus* Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus caridiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Derivatisierung mit NR/PEG

	Plattenbezeichnung			
	Leo 20081124 01 02	Leo 20081125 01	Leo 20081126 01	
Bande	R_F			ΔR_F
Kaffeesäure	0,86	0,88	0,84	0,02
gelbe Bande über Hyperosid	0,60	0,63	0,57	0,03
Hyperosid	0,54	0,57	0,52	0,03
Rutin	0,37	0,42	0,35	0,05
blaue Bande unter Rutin	0,20	0,21	0,19	0,02

Nach Auswertung der dokumentierten Platten (Tab. 110) konnte die Laborpräzision akzeptiert werden.

3.5.1.3.7 Robustheit

3.5.1.3.7.1 Plattentyp

Es wurde eine DC-Aluminiumfolie mit einer HPTLC-Glasplatte verglichen. Für die HPTLC-Platte wurde die Methode wie unter 3.3.5.2 beschrieben durchgeführt. Für eine Übertragung der Methode auf kieselgelbeschichtete DC-Aluminiumfolien wurde eine entsprechende Untersuchung durchgeführt. Als Ziellaufstrecke wurden 100 mm gewählt, die vom Hersteller als optimale Trennstrecke angegeben wird (Abb. 113). Die Entwicklung erfolgt in einer 200x200 mm Doppeltrogkammer. Für den Vergleich wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisions-messung verwendet.

Für die Akzeptanz des Tests sollten alle Banden für die beiden entwickelten Platten in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Zonen gleich sein. Ein Unterschied der repräsentativen Banden von nicht größer als 0,06 R_F -Einheiten wurde akzeptiert.

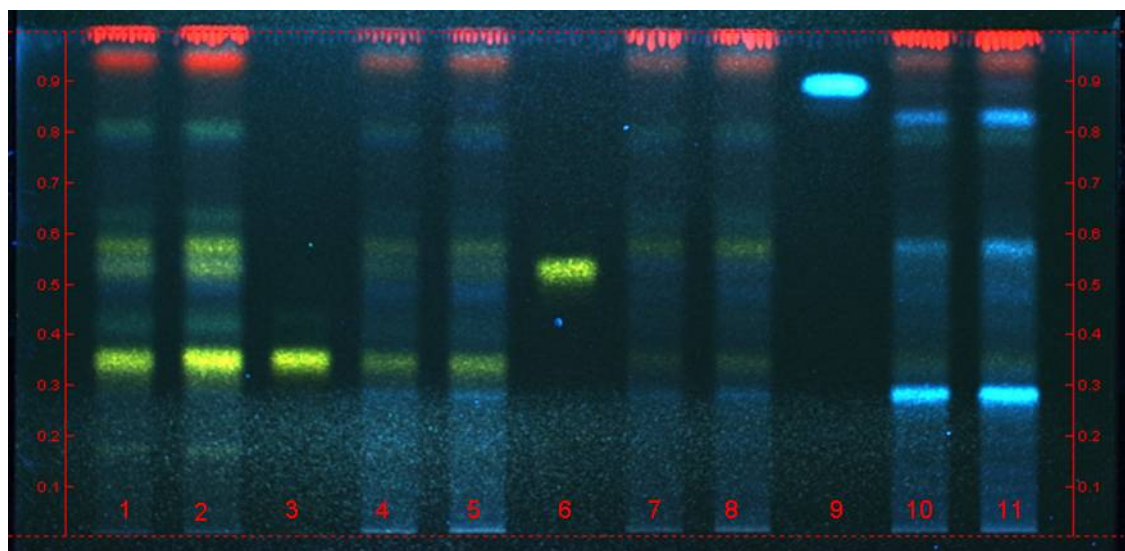


Abb. 113: DC-Robustheit (Leonuri herba)

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 μ l: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus caridiaca* Proben jeweils 10 u. 15 μ l: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 μ l; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2 μ l; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3 μ l; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme nach Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Laufstrecke 100 mm

Tabelle 111: DC-Robustheit, Leonuri herba (zu Abb. 113)

	Plattenbezeichnung		
	DC-Aluminiumfolie Leo_20081126_03	HPTLC-Glasplatte Leo_20081124_01_02	
Bande	R_F		ΔR_F
Kaffeesäure	0,89	0,86	0,03
gelbe Bande über Hyperosid	0,58	0,60	0,02
Hyperosid	0,53	0,54	0,01
Rutin	0,36	0,37	0,01
blaue Bande unter Rutin	0,26	0,20	0,06

Die Untersuchung der Robustheit bezüglich des Plattentyps zeigte keine Abweichungen größer der geforderten 0,06 R_F -Werteinheiten (Tab. 111). Der Test konnte akzeptiert werden.

3.5.1.3.7.2 Entwicklungsstrecke

Mit Ausnahme der Entwicklungsstrecke wurde die Methode wie unter 3.3.5.2 beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Platte mit einer Laufstrecke von 40 mm (Abb. 114) und eine Platte mit einer Laufstrecke von 60 mm (Abb. 115) entwickelt. Für den Vergleich wurde die Platte der ersten Wiederholpräzisionsmessung verwendet.

Die Kriterien für die Akzeptierung des Tests waren, dass alle Banden für die beiden entwickelten Platten in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Zonen gleich sind. Ein Unterschied der repräsentativen Banden von nicht größer als 0,06 R_F -Einheiten wurde akzeptiert.

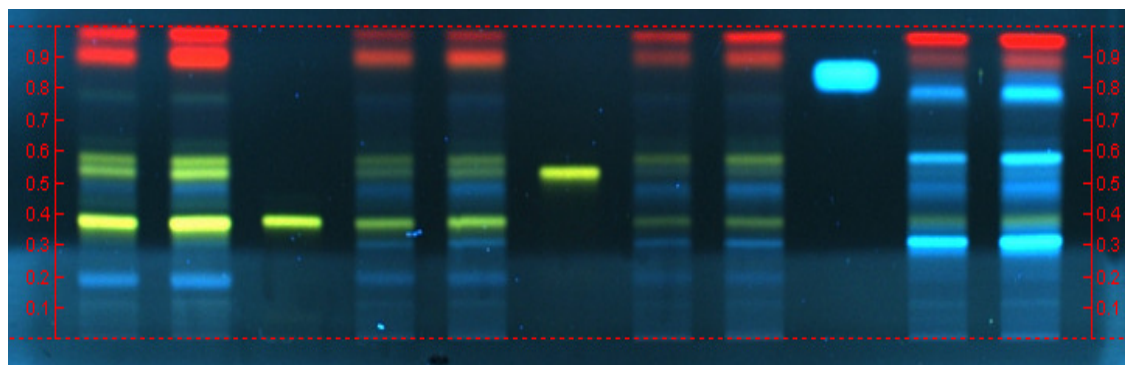


Abb. 114: HPTLC-Robustheit (40 mm, Leonuri herba)

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus cardiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme nach Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Laufstrecke 40 mm; Platte: Leo_20081125_03

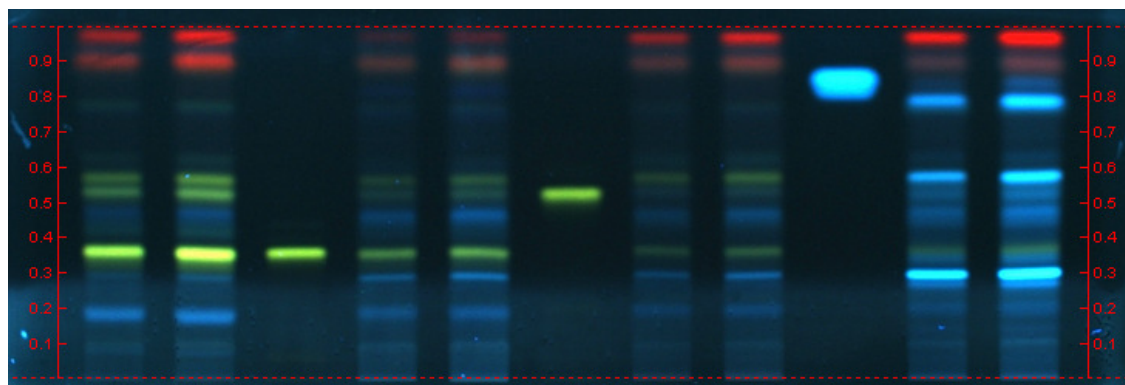


Abb. 115: HPTLC-Robustheit (60 mm, Leonuri herba)

Leonurus japonicus Proben jeweils 10 und 15 µl: Bahn 1, 2, 4, 5, 7, 8; *Leonurus cardiaca* Proben jeweils 10 u. 15 µl: Bahn 10, 11, Referenzen: Bahn 3 Rutin (2 µl; 1mg/ml), Bahn 6 Hyperosid (2µl; 1mg/ml), Bahn 9 Kaffeesäure (3µl; 1 mg/ml), Fließmittel: wasserfreie Ameisensäure, Wasser, Ethylacetat (15:10:75), Aufnahme nach Derivatisierung mit NR/PEG, Bild bei 366 nm, Laufstrecke 60 mm, Platte: Leo_20081126_02

Tabelle 112: Robustheit der Entwicklungsstrecke, Leonuri herba

	Plattenbezeichnung			
	Leo_20081125_03 40 mm	Leo_20081124_01_02 50 mm	Leo_20081126_02 60 mm	
Bande	R_F			ΔR_F
Kaffeesäure	0,85	0,86	0,85	0,01
gelbe Bande über Hyperosid	0,59	0,60	0,59	0,01
Hyperosid	0,54	0,54	0,53	0,01
Rutin	0,37	0,37	0,36	0,01
blaue Bande unter Rutin	0,21	0,20	0,19	0,01

Die Untersuchung der Robustheit bezüglich der Laufstrecke lieferte keine Abweichungen außerhalb der geforderten 0,06 R_F -Werteinheiten (Tab. 112). Die Experimente zur Prüfung der Robustheit konnten akzeptiert werden.

3.5.2 Bestimmung des Trocknungsverlustes

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g Droge in ein Wägegglas genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet (Tab. 113).

Tabelle 113: Trocknungsverlust

MW [%]: Mittelwert des Trocknungsverlustes der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe			
	LhP1	LhP2	LhP3	LhP4
	Trocknungsverlust [%]:			
1. Einwaage	9,01	8,74	8,46	9,4
2. Einwaage	9,10	8,69	8,56	9,46
3. Einwaage	9,05	8,79	8,61	9,32
MW [%]	9,05	8,74	8,54	9,39
STABWN [%]	0,04	0,04	0,06	0,06
Varianz [%]	0,41	0,47	0,73	0,61

3.5.3 Bestimmung der Asche

Die Bestimmung der Asche wurde mit jeder Drogenprobe in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurde jeweils ca. 1,000 g pulverisierte Droge [355] in einen Quarztiegel genau eingewogen und in einem Trockenschrank bei 105 °C eine Stunde getrocknet. Anschließend wurde das Pulver im Muffelofen bei 600 °C zur Massenkonstanz geglüht (Tab. 114).

Tabelle 114: Bestimmung der Asche

MW [%]: Mittelwert der Asche der drei Einwaagen in %; STABWN [%]: Standardabweichung berechnet nach Excelfunktion STABWN, Varianz: Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert

	Probe			
	LhP1	LhP2	LhP3	LhP4
	Asche[%]:			
1. Einwaage	9,09	6,70	9,60	9,00
2. Einwaage	9,06	6,70	9,61	8,36
3. Einwaage	9,09	6,67	9,59	8,44
MW [%]	9,08	6,69	9,60	8,60
STABWN [%]	0,01	0,01	0,01	0,29
Varianz [%]	0,10	0,20	0,07	3,33

3.5.4 Gehaltsbestimmung Gesamtflavonoide

Für die Gehaltsbestimmung ist in der Monographie Leonuri herba der Ph. VR China (2005) eine aufwendige Extraktion mit anschließender dünnschichtchromatographischer Trennung und densitometrischer Quantifizierung vorgeschrieben. Das vorgeschlagene Plattenmaterial aus Carboxymethylcellulose kann von keinem Anbieter in Europa geliefert werden. Eine Verwendung von herkömmlichen Cellulose Platten kann nicht erfolgen, da sich die Platten unter den salzsauerer Bedingungen auflösen. Eine Umstellung auf übliche Kieselgelplatten erschien durchführbar, die Derivatisierung mit Dragendorff's Reagenz und einer anschließenden densitometrischen Quantifizierung war aber mit nicht mit verlässlichen und reproduzierbaren Ergebnissen durchführbar (Resultate nicht dargestellt). Dies ist in gleicher Weise von BOMME (2008) untersucht und bewertet worden.

Für die Gehaltsbestimmung wurde nach einer einfachen Alternative gesucht. Hier bietet sich eine etablierte Methode für die Flavonoidbestimmung nach Hydrolyse an, wie sie in der Monographie für Herzgespannkräut in der Ph. Eur. (2008e) durchgeführt wird. Eine Validierung der Methode wurde nicht durchgeführt, da die Methoden des Arzneibuchs als validiert gelten. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 115.

Tabelle 115: Ergebnisse Gesamtflavonoidbestimmung von Leonuri herba

	Probe							
	LhP1		LhP2		LhP3		LhP4	
	Einwaage	Absorption	Einwaage	Absorption	Einwaage	Absorption	Einwaage	Absorption
1. Einwaage	1,00164	0,2142	0,99381	0,1206	1,08594	0,7966	1,00359	0,3003
2. Einwaage	1,00441	0,2271	0,99879	0,1093	1,02483	0,6387	1,01472	0,2799
3. Einwaage	1,00464	0,2536	0,99400	0,1352	1,04152	0,7868	1,02080	0,3446
	% - Gehalt							
1. Einwaage	0,27		0,15		0,92		0,37	
2. Einwaage	0,28		0,14		0,78		0,34	
3. Einwaage	0,32		0,17		0,94		0,42	
Mittelwert	0,29		0,15		0,88		0,38	
V _K	6,97		8,89		8,22		8,37	

4 Diskussion

4.1 Astragali radix

Die makroskopische Untersuchung der Astragali radix Proben verschiedener Herkunft zeigten ein unterschiedliches morphologisches Erscheinungsbild der Droge wie es auch in der Literatur beschrieben ist [UPTON (1999)]. Bei den von deutschen Anbietern gelieferten Drogenmaterial handelte es sich um in Scheiben geschnittenes Material. Die authentische Probe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft zeigte ein heterogenes Erscheinungsbild mit unterschiedlich dicken und langen Bruchstücken, die teilweise stark ausgefranst waren. Bei den Proben eines Schweizer Anbieters und der Hongkong Ware waren die Wurzeldurchmesser dicker und diagonal zur Wachstumsachse geschnitten. Der dickere Durchmesser der Wurzel könnte ein Hinweis auf das höhere Alter der Wurzeln sein. Eine Rückschluss auf die Qualität der Ware kann aber durch die Dicke und die Art des Schnittes nicht getroffen werden.

Die mikroskopische Untersuchung von Astragali radix lieferte ein homogenes Bild der gefundenen Merkmale. Es wurden Faserbündel, Gefäße, parenchymatisches Gewebe und Stärkekörner gefunden. Die ist auch in verschiedenen Literaturstellen zu finden: UPTON (1999), Monographie Radix Astragali Ph. VR China (2005b), Monographie Radix Astragali Hongkong Materia Medica Standards Vol 1 (2005a).

Für die Identifizierung mittels DC wurde die sehr aufwendige Methode für die Herstellung der Untersuchungslösung aus der Ph. VR China durch eine Extraktion mit Methanol/Ethylacetat und nachfolgendem Einengen ersetzt. Der Fingerprint unterschied sich nur unwesentlich von der Methode aus Ph. VR China. Hauptsächlich ist davon Astragalosid IV betroffen, das mit dieser Methode nicht im gleichen Maß aufkonzentriert wird. Ferner stören im unteren R_F -Bereich die mitextrahierten polaren Begleitstoffe die Detektion von Astragalosid IV. Wenn eine derivatisierte Glasplatte von der Rückseite betrachtet wurde, war die schwache Bande des Astragalosid IV gut erkennbar. Für eine sichere Identifizierung war aber das Vorhandensein des Astragalosid IV im Fingerprint-Chromatogramm nicht notwendig. Entscheidend ist der Fingerprint, durch den eine Aussage für die Identität der Droge getroffen werden konnte. Die Frage der Identität ist mit der vorgeschlagenen Methode gut zu beantworten, zumal bei der bekannten und häufigen Verunreinigung *Hedysarum spec.* [Ph. J. (2006)], [Upton (1999)], [CHM Materia Medica (2004b)] keine Astragaloside vorhanden sind und daher eine entsprechende Ersatz der Droge ausgeschlossen werden kann.

Das Fließmittel von WAGNER (1997) wurde modifiziert, um mit der polareren mobilen Phase die Astragaloside aus dem ersten Dritteler Laufstrecke besser trennen zu können, weil eine Entzerrung der Banden erhalten wurde. Da eine Quantifizierung mittels Desitometrie durchgeführt werden sollte, war dies methodisch von grundlegender Bedeutung. In der Methode nach WAGNER (1997) wird die hämolytische Aktivität der Astragaloside ausgenützt und eine entwickelte DC-Platte mit Blutreagenz derivatisiert, um die Astragaloside nachzuweisen. Auf eine Überprüfung der Derivatisierung wurde verzichtet. Auch wurden die halogenierten Lösungsmitteln aus Gründen der Arbeitssicherheit ersetzt.

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden Robustheitstests mit DC-Aluminiumfolien durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen nicht bei allen Referenzsubstanzen den im Validierungsprotokoll festgelegten Forderungen. Astragalosid I wies einen Unterschied $> 0,06 R_F$ -Einheiten im Vergleich zu den HPTLC-Platten auf. Der Fingerprint unterschied sich jedoch bezüglich der Bandenabfolge nicht. Deshalb kann eine Entwicklung mit DC-Platten zur Identitätsprüfung erfolgen, da kein grundsätzlicher unterschiedlicher Fingerprint erhalten wurde. Mit der neu entwickelten und validierten HPTLC-Methode konnte die Identität der Droge chromatographisch sicher nachgewiesen werden.

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes für Drogen ist in der Monographie der Ph. VR China nicht vorgesehen, ist aber für Monographien des DAB üblich und wurde deshalb durchgeführt. Es ergaben sich hier Werte zwischen 7 und 11 % Trocknungsverlust. Bei HÄNSEL (2007) werden Werte zwischen 5 und 15% als Normbereich angesehen. Für die geplante Monographie wird ein maximaler Wert von 12% Trocknungsverlust vorgeschlagen.

Für den Ascherückstand sieht die Monographie der Ph. VR einen Maximalwert von 5% vor. Die hier ermittelten Werte liegen im Bereich von 2 bis 3% Asche. Für den Monographie wird ein Maximalwert von 5% vorgeschlagen.

Auf spezielle Angaben der Ph. VR China, die im Ph. Eur. nicht üblich sind wurde verzichtet. Dies sind Processing, Action, Indication, Usage and Dosage.

Eine quantitative Untersuchung konnte nicht durchgeführt werden. Für den Monographievorschlag wurde deshalb auf den Entwurf in der „EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, Group 13A“ zu einer Monographie für *Astragali radix* VLIETINCK (2007) zurückgegriffen.

4.2 *Coptidis rhizoma*

Für die makroskopische Untersuchung standen nur Proben der Spezies *C. chinensis* zur Verfügung. Die makroskopische Untersuchung der *Coptidis rhizoma* Proben verschiedener Herkunft zeigten unterschiedliche Erscheinungsbilder. Die Ph. VR China beschreibt

Bruchstücke größerer Rhizomteile die 3 – 6 cm lang sind. Die geschnittenen Rhizome werden nicht erwähnt, sind aber bedingt durch Form und Farbe sehr charakteristisch, so dass eine Verwechslung unwahrscheinlich erscheint. Zum einen lag geschnittenes Drogenmaterial vor, zum anderen Bruchstücke von mehr oder weniger zusammenhängenden Rhizomteilen. Bei den geschnittenen Drogen war der Holzteil gut erkennbar, gelb-orange und radial angeordnet. Bei den gebrochenen Drogen war der radiale Aufbau des Holzteils nur mäßig gut erkennbar. Gut erkennbar waren hier die anhaftenden Niederblätter, Wurzeln und der verzweigte Aufbau der Rhizome. Für den Monographievorschlag wurden alle charakteristischen Merkmale aufgeführt. Ein Rückschluss auf die Qualität der Ware kann durch die Art des Schnittes nicht getroffen werden.

Für die mikroskopische Untersuchung konnten Proben der Spezies *C. chinensis*, *C. deltoidea* und *C. teeta* untersucht werden. Als gemeinsame Merkmale wurden Korkfragmente, Gefäße mit Tüpfelung, parenchymatische Zellen und Stärke gefunden. Unterschiede ergaben sich bei *C. chinensis* und *C. deltoidea* in der Form der Steinzellen. Die Steinzellen von *C. chinensis* waren rund bis leicht eckig, mit einem engen Zelllumen und bei *C. deltoidea* auffallend rechteckig mit einem weitem Zelllumen. Angaben zu der Form der Steinzellen wurden in der Literatur nicht gefunden. Die Spezies *C. teeta* besitzt keine Steinzellen, dies findet sich auch in der Ph. VR China bestätigt.

Für die Identitätsprüfung mittels DC und HPTLC wurde die Methode des Ph. VR China übernommen und validiert. Eine Unterscheidung der Spezies *C. chinensis*, *C. deltoidea* und *C. teeta* ist mittels dieser Methode möglich. Problematisch ist die Verwendung von konzentrierter Ammoniak-Lösung zum Abstumpfen der Kieselgelplatten. Zum einen wird die ammoniakalische Gasphase durch Luftzug zerstört, so dass es zu unterschiedlichen R_F -Werten von identischen Banden auf einer Platte kommt. Deshalb ist auf die Positionierung der Entwicklungskammer im Labor zu achten, wobei die Aufstellung in einem Abzug ausscheidet. Dies kann zu einer Belastung des Labors mit dem Ammoniakdampf führen, der bei der Entnahme der entwickelten Platte frei wird. Für Routineuntersuchungen ist diese Methode deshalb wenig geeignet. Eine Alternative ist die Methode von AKIRA (1983). Es wurde hier nur noch die Spezifität der Methode untersucht. Diese war nach ICH Q2(R1) für eine DC/HPTLC-Identitätsprüfung ausreichend.

Die Bestimmung des Trocknungsverlustes für Drogen ist in der Monographie der Ph. VR China nicht vorgesehen, ist aber für eine Monographie des DAB erforderlich. Es ergaben sich Werte zwischen 8,5 und 9,2% Trocknungsverlust. Bei HÄNSEL (2007) wurden Werte zwischen 5 und 15% als Normbereich angesehen. Für einen Monographievorschlag wurde ein maximaler Wert von 10% vorgeschlagen.

Für den Ascherückstand sieht die Monographie der Ph. VR China einen Maximalwert von 5% vor. Die ermittelten Werte lagen im Bereich von 2 bis 3% Asche. Für die Monographie wurde ein Maximalwert von 4% vorgeschlagen, da besonders bei nicht geschnittenen Drogen der Anteil von anhaftenden mineralischen Verunreinigungen größer sein kann.

Beginnend mit Berberin, das in der Monographie der Ph. VR China quantitativ bestimmt wird, sind die ebenfalls in den Stammpflanzen vorhandenen Substanzen Coptisin, Epiberberin und Palmatin quantifiziert worden. Es wurde die densitometrische Methode der Ph. VR China mit einer neuentwickelten HPLC-Methode verglichen. Ausgangspunkt für die HPLC-Methode war die Monographie nach WAGNER (2004), die bei erstmaliger Durchführung zu einer sehr guten Trennung der extrahierten Alkaloidfraktion führte. Eine Überprüfung an mehreren Tagen führte zu schwankenden Retentionszeiten der einzelnen Alkaloidpeaks. Daher wurde eine Trennung auf dem selben Säulenmaterial und Fließmittel ohne Natriumdodecylsulfat in der mobilen Phase entwickelt. Es zeigte sich auch mit dieser Methode ein Drift der Retentionszeiten. Abschließend wurde die stationäre Phase ausgetauscht. Mit der Verwendung einer vollständig endcappten RP-Phase konnte eine validierte Quantifizierung der Alkaloide durchgeführt werden. Der Vergleich von densitometrischer und HPLC-Methode führten zu Methodenparameter, die in ähnlichen Bereichen lagen, und die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung unterschieden sich nur geringfügig. Es wurden die Gehalte der Inhaltsstoffe Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin bestimmt. Für Berberin wurden bei der densitometrischen Methode Gehalte zwischen 7,7 und 9,6 % gefunden. Die Gehalte bei der HPLC-Methode lagen zwischen 6,4 und 7,3 %. Die HPTLC-Methode wurde wegen des zu verwendenden Ammoniaks nicht für die Monographie vorgeschlagen. Die Monographie der Ph. VR China fordert einen Mindestgehalt von 3,6 % Berberin. Da die ermittelten Werte erheblich höher lagen, wurde ein Mindestgehalt von 5,0% Berberin für die Monographie vorgeschlagen.

Auf die speziellen Angaben der Ph. VR China, die im Ph. Eur. nicht üblich sind, wurde auch hier verzichtet. Da auf dem Markt in Deutschland nur Drogen der Spezies *C. chinensis* angeboten werden, wurde der Monographievorschlag auf diese Spezies beschränkt.

4.3 Forsythiae fructus

Die makroskopische Untersuchung der Forsythiae fructus Proben verschiedener Herkunft zeigten ein identisches Erscheinungsbild. Die Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen decken sich mit den Angaben der Monographie Fructus Forsythiae aus der Ph. VR China. Die charakteristische Droge besteht aus den Früchten, Samen und Fruchtsielen.

Bei der mikroskopische Untersuchung des Pulvers wurden Epidermisfragmente, Gefäße mit Tüpfelung, parenchymatische Zellen und längliche Steinzellen gefunden. Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen decken sich mit den Angaben der Monographie *Fructus Forsythiae* aus der Ph. VR China.

Für die Identitätsprüfung mittels DC/HPTLC wurde die Extraktion der Droge mit Methanol durchgeführt und so der Aufwand im Vergleich zu der Methode der Monographie der Ph. VR China erheblich reduziert. Das Fließmittel wurde aus der Monographie übernommen und die Methode validiert. Eine Identifizierung der Droge ist damit uneingeschränkt möglich.

Bei der Bestimmung des Trocknungsverlustes ergaben sich Werte zwischen 7,9 und 8,2%, die Monographie der Ph. VR China fordert einen Wert nicht höher 10%. Für die Monographie wurde ein Wert von nicht höher 10% vorgeschlagen.

Für den Ascherückstand sieht die Monographie der Ph. VR einen Maximalwert von 4% vor. Die ermittelten Werte lagen im Bereich von 2,2 bis 3,0% Asche. Für die Monographie wurde ein Maximalwert von 4 % vorgeschlagen.

Als Inhaltsstoffgruppen werden für *Forsythiae fructus* Kaffesäureester und Lignane genannt [WAGNER (2005)]. Für beide Inhaltsstoffgruppen sind in der Vergangenheit Untersuchungen durchgeführt worden. Da Forsythosid A auch in Ph. VR China quantifiziert wird, wurde die quantitative Bestimmung mit dieser Substanz durchgeführt. Eine neuentwickelte densitometrische Methode wurde mit einer neuentwickelten HPLC-Methode verglichen. Die Extraktion wurde mit Methanol unter Rückfluß durchgeführt. Die gefundenen Gehalte an Forsythosid A lagen bei der densitometrischen Methode zwischen 0,36 und 0,64 % und bei der HPLC-Methode zwischen 0,36 und 0,68 %. Die Methodenparameter für beide Methoden liegen in ähnlichen Bereichen. Für die Monographie des DAB wurde die HPLC als etablierte Methode vorgeschlagen. Auf die speziellen Angaben der Ph. VR China, die im Ph. Eur. nicht üblich sind, wurde verzichtet.

4.4 Leonuri japonici herba

Die makroskopische Untersuchung der authentischen *Leonuri japonici herba* Probe der LfL zeigte Blattfragmenten, Stängeln und Blütenknospen. Die Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen decken sich mit den Angaben der Monographie *Herba Leonuri* aus der Ph. VR China.

Bei der mikroskopische Untersuchung wurden Gefäßfragmente, Kollenchym, Asteraceaendrüsenschuppen und Haare gefunden. Die Ergebnisse der mikroskopischen

Untersuchungen decken sich mit den Angaben der Monographie *Herba Leonuri* aus der Ph. VR China.

Für die Identitätsprüfung mittels DC wurde eine Methode entwickelt, die den Flavonoidfingerprint der Droge zeigt. Die Extraktion wurde mit Methanol durchgeführt. Die Ph. VR China führt eine sehr aufwendige Aufkonzentrierung und anschließende Detektion des Stachydrins durch. Stachydrin ist in der nahe verwandten und in der Ph. Eur. monographierten Droge *Leonuri cardiaca* herba ebenfalls vorhanden. Die Identitäts-Chromatogramme der beiden Drogen nach Aufkonzentrierung des Stachydrins unterschieden sich bei der Extraktionsmethode nach Ph. VR China nicht. Der Flavonoidfingerprint der beiden Drogen unterschied sich jedoch deutlich, eine Identifizierung der Droge ist damit uneingeschränkt möglich.

Bei der Bestimmung des Trocknungsverlustes ergaben sich Werte zwischen 8,5 und 9,1%, die Monographie der Ph. VR China fordert einen Wert nicht höher 13 %. Für die Monographie wurde ein Wert von nicht höher 13 % vorgeschlagen.

Der Ascherückstand der Monographie der Ph. VR sieht einen Maximalwert von 11% vor. Die ermittelten Werte lagen im Bereich von 6,7 bis 9,1 % Asche. Für die Monographie wurde ein Maximalwert von maximal 10 % vorgeschlagen.

Für die Gehaltsbestimmung wurde eine spektroskopische Gesamtflavonoidbestimmung mittels Photometer vorgeschlagen. Es wurden Flavonoidgehalte, berechnet als Hyperosid, zwischen 0,15 und 0,88 % ermittelt. Die Bestimmung des im Ph VR China vorgeschlagenen Stachydrin mittels Dünnschichtchromatographie, Derivatisierung mit Dragendorffs Reagenz und folgender densitometrischer Vermessung war nicht durchführbar, da keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten wurden.

Auf die speziellen Angaben der Ph. VR China, die im Ph. Eur. nicht üblich sind, wurde verzichtet.

5 Zusammenfassung-Monographievorschläge

5.1 Goldfadenwurzelstock

Goldfadenwurzelstock

Coptidis rhizoma

黄连, Huang Lian

Definition

Goldfadenwurzelstock ist das getrocknete Rhizom von *Coptis chinensis* Franch. Die Droge wird im Herbst gesammelt, von kleinen Wurzeln und Erde befreit, und getrocknet. Gehalt: mindestens 5 Prozent Berberin ($C_{20}H_{18}NO_4Cl \times 2 H_2O$, M_r : 407,9) (getrocknete Droge).

Eigenschaften

Der Geruch ist eigentümlich, der Geschmack ist stark bitter und zusammenziehend.

Makroskopische und mikroskopische Merkmale werden unter „Prüfung auf Identität, A und B“ beschrieben.

Prüfung auf Identität

- A. Die Rhizome von *Coptis chinensis* sind häufig in Gruppen zusammenhängend, gebogen, und erinnert an „Hühnerfüsse“. Einzelne Rhizome sind 30 bis 60 mm lang, 3 bis 8 mm im Durchmesser. Die Rhizomoberfläche ist gelb-braun bis gelb-grau gefärbt, viele kleine Nodien sind erkennbar, dadurch ist die Oberfläche knotig-runzelig. Kleine Wurzeln und Wurzelreste sind vorhanden. Dünnere Rhizomteile besitzen erkennbare Internodien mit glatter Oberfläche. Vereinzelt sind an den Rhizomteilen Niederblätter und Narben von Niederblättern erkennbar. An den Rhizomenden finden sich Sprossreste. Die Bruchstellen der harten Rhizome sind ungleichmäßig, die Borke ist orange-rot bis braun, der Holzteil ist gelb-orange gefärbt und radial angeordnet. Das Mark orange-rot bis braun gefärbt, bei dickeren Rhizomteilen ist das Mark nur teilweise vorhanden oder hohl.
- B. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist orange-braun. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat Lösung R verwendet wird.
Das Pulver zeigt folgende Merkmale: Korkfragmente die in der Aufsicht fünf bis sechseckige braune Zellwände zeigen; Gefäßfragmente mit Tüpfelung, die regelmäßig in einer oder zweier Reihen angeordnet sind; parenchymatische Zellen mit gequollener Stärke; Steinzellen, teilweise im Verband, rund bis leicht eckig und einer Größe von 50 bis 100 µm und einem engen Lumen.
- C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 0,1 g pulverisierte Droge (355) werden 15 Minuten mit 100 mL Methanol R unter Rückflusskühlung erhitzt. Die erhaltene Lösung filtriert und mit Methanol R auf 10 mL aufgefüllt.

Referenzlösungen: 5 mg Berberinchlorid und 5 mg Palmatin werden zu 100,0 mL gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel G R

Fließmittel: Ethylacetat R, Toluol R, Methanol R, Diethylamin R, Ammoniak R (8:2:2:0,5:1 V/V/V/V)

Auftragen: 5 µL Referenzlösung und 5 µL Untersuchungslösung, bandförmig 10 mm [5 mm]

Laufstrecke: 100 mm [50 mm]

Trocknen: im Kaltluftstrom 10 Minuten

Detektion: Die Platte wird im UV-Licht bei 365 nm ausgewertet.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können weitere Zonen vorhanden sein.

Oberer Plattenrand	
Berberin: eine gelb fluoreszierende Bande	Eine gelb fluoreszierende Bande (Berberin) Eine gelb fluoreszierende Bande (Epiberberin)
Palmatin: eine grün fluoreszierende Bande	Eine grün fluoreszierende Bande (Coptisin) Eine grün fluoreszierende Bande (Palmatin)
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 5 Prozent Wurzel- und Blattanteile und höchstens 3 Prozent sonstige fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): Höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 3,5 Prozent

Gehaltsbestimmung

Flüssigkeitschromatographie

Untersuchungslösung: In einem 100-mL-Rundkolben mit Schliff werden 0,100 g pulverisierte Droge (355) mit 95 mL einer Mischung von Methanol R und Salzsäure R (100:1) versetzt und in einem Ultraschallbad 20 Minuten extrahiert. Von der überstehenden Lösung werden ca. 1,5 mL abgenommen und durch einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert. Die filtrierte Lösung ist die Untersuchungslösung.

Referenzlösung: 10,0 mg Berberin, werden in Methanol R zu 100,0 mL gelöst

Säule:

-Größe: l = 0,250 m, Ø = 4 mm

-Stationäre Phase: octadodecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)
z.B.: Purosphere STAR RP-18e (5 µm), Hibar® RT250-4, mit Vorsäule

Säulentemperatur: 25 °C

Flussrate: 0,7 mL/min

Mobile Phase:

Fließmittel A: Wasser mit 0,5% ortho-Phosphorsäure 85% (V/V)

Fließmittel B: Acetonitril R mit 0,5% ortho-Phosphorsäure 85% (V/V)

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [%V/V]
0 - 10	80	20
10 - 20	80→79	20→21
20 - 35	79→65	21→35
35 - 36	65	35
36 - 37	65→80	35→20
37 - 47	80	20

Injektionsvolumen: 10 µL

Detektion: Spektrometer bei 344 nm

Eigungsprüfung:

- Auflösung: mindestens 1,5 zwischen den Peaks von Berberin und dem Peak vor Berberin (Palmatin)

Der Prozentgehalt an Berberin wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{F_1 * m_2 * 1000}{F_2 * m_1}$$

F_1 = Peakfläche des Berberins im Chromatogramm der Untersuchungslösung

F_2 = Peakfläche des Berberins im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Konzentration der Droge in Milligramm je Milliliter

m_2 = Konzentration des Berberins in Milligramm je Milliliter

5.2 Forsythiafrüchte

Forsythiafrüchte

Forsythiae fructus

连翘, Lao qiao

Definition

Frosythienfrüchte sind die reifen und getrockneten Früchte von *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. Die Droge wird im Herbst gesammelt und von fremden Bestandteilen befreit. Gehalt: Die Droge enthält mindestens 0,15 Prozent (*m/m*) Forsythosid A bezogen auf die getrocknete Droge

Eigenschaften

Der Geruch ist eigentümlich, der Geschmack ist schwach bitter zusammenziehend, mehlig und schwach aromatisch.

Makroskopische und mikroskopische Merkmale werden unter „Prüfung auf Identität, A und B“ beschrieben.

Prüfung auf Identität

A. Die Früchte sind länglich oval, spitz zu laufend, leicht abgeflacht, 15 bis 25 mm lang, 5 bis 15 mm im Durchmesser und meist von der Spitze her aufgeplatzt oder in zwei Teile zerfallen. Es haftet ein Fruchtsiel an oder es ist eine Fruchtsielnarbe vorhanden. Die Fruchtoberfläche weist längsverlaufende unregelmäßige Runzeln auf, zahlreiche Makula sind vorhanden. Die Farbe der äußeren Oberfläche ist gelb-braun bis rot-braun. Die innere Oberfläche ist gelb-braun, glatt, mit einem länglichen Septum dessen Gewebe brüchig ist.

B. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist orange-braun. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat Lösung R verwendet wird.

Das Pulver von zeigt folgende Merkmale:

Parenchymatische Zellverbände, in der Aufsicht fünf bis sechseckig mit gelb-braune Zellwänden, einer Breite von 25 – 50 µm, einer Länge von 30 -60 µm und einer Zellwandbreite von 3 µm; selten Gefäßfragmente; Steinzellen, oft in mehrschichtigen Verbänden (bis zu fünf Schichten), einzelne Steinzellen länglich, mit unterschiedlicher Breite, Länge und Zellwanddicke.

Vereinzelt sind Epidermisfragmente mit Cuticula zu erkennen.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 1 g pulverisierte Droge (355) wird 10 Minuten mit 10 mL Methanol R im Ultraschallbad extrahiert. Die erhaltene Lösung filtriert, das Filtrat als Testlösung verwendet.

Referenzlösungen: 10,0 mg Pinoresinol und 10,0 mg Salidroside werden zu 10,0 mL Methanol R gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel G R

Fließmittel: Toluol R, Aceton R, Ethylacetat R, Ameisensäure R, Wasser R (40:50:60:6:6 V/V/V/V/V)

Auftragen: 10 µL [5 µL] Referenzlösung und 10 µL [5 µL] Untersuchungslösung, bandförmig 10 mm [5 mm]

Laufstrecke: 100 mm [60 mm]

Trocknen: im Kaltluftstrom 10 Minuten

Derivatisierung: Vanillin-Reagenz R, 10 Minuten bei 110 °C trocknen

Detektion: Die Platte wird im UV-Licht bei 366 nm ausgewertet.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich.

Oberer Plattenrand	
Pinoresinol: eine schwarze Bande	Eine rot fluoreszierende Bande Eine rot fluoreszierende Bande Eine rot fluoreszierende Bande
Salidosid: eine orange fluoreszierende Bande	Eine gelb fluoreszierende Bande Eine gelb fluoreszierende Bande
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 9,0 Prozent fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 4,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Flüssigkeitschromatographie

Untersuchungslösung: In einem 100-mL-Rundkolben mit Schliff werden 0,500 g pulverisierte Droge (355) mit 100 mL Methanol R versetzt und unter Rückflusskühlung in einem Wasserbad bei $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 30 Minuten extrahiert. Von dieser Lösung werden ca. 1,5 mL abgenommen und durch einen Membranfilter filtriert (0,45 µm). Die filtrierte Lösung ist die Untersuchungslösung.

Referenzlösung: 3,0 mg Forsythosid A werden in Methanol R zu 100,0 mL gelöst

Säule:

-Größe: $l = 0,250 \text{ m}$, $\varnothing = 4 \text{ mm}$

-Stationäre Phase: octadodecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)
z.B.: Purosphere STAR RP-18e (5 µm), Hibar ® RT250-4, mit Vorsäule

Säulentemperatur: 25 °C

Flussrate: 0,6 mL/min

Mobile Phase:

- Mobile Phase A: Wasser R mit 0,1% wasserfreier Ameisensäure R
- Mobile Phase B: Acetonitril R mit 0,1% wasserfreier Ameisensäure R

Zeit [min]	Mobile Phase A [% V/V]	Mobile Phase B [% V/V]
0 - 20	83→77,5	17→22,5
20 - 25	77,5→10	22,5→90
25 - 30	10→83	90→17
30 - 35	17	83

Flussrate: 0,6 mL/min
 Detektion: 325 nm
 Säulenofen: 25°C

Injektionsvolumen: 10 µL

Detektion: Spektrometer bei 325 nm

Eigungsprüfung:

- Auflösung: mindestens 1,0 zwischen den Peaks von Forsythosid A und dem folgendem Peak

Der Prozentgehalt an Forsythosid A wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{F_1 * m_2 * 100}{F_2 * m_1}$$

F₁ = Peakfläche des Forsythosid A im Chromatogramm der Untersuchungslösung

F₂ = Peakfläche des Forsythosid A im Chromatogramm der Referenzlösung

m₁ = Konzentration der Droge in Milligramm je Milliliter

m₂ = Konzentration des Forsythosid A in Milligramm je Milliliter

5.3 Chinesisches Mutterkraut

Chinesisches Mutterkraut

Leonuri herba

 , Yi Mu Cao

Definition

Chinesisches Mutterkraut enthält die getrockneten oberirdischen Teile von *Leonurus japonicus* Houtt. (Fam. Lamiaceae). Die Droge wird zu Beginn oder vor der Blüte geerntet und getrocknet. Gehalt: mindestens 0,3 Prozent Flavonoide, berechnet als Hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$; M_r 464,4) bezogen auf die getrocknete Droge.

Eigenschaften

Makroskopische und mikroskopische Merkmale werden unter „Prüfung auf Identität, A und B“ beschrieben.

Prüfung auf Identität

A. Das Kraut enthält grün-gräuliche, widerstandsfähige und ausgeprägt vierkantige Stängel mit einem Durchmesser von ca. 2 - 10 mm. Vor allem bei dickeren Stengelteilstücken ist im Zentrum weißes Mark erkennbar. Die Stängel sind senkrecht gefurcht, jüngere Triebe sind deutlich dünner im Durchmesser und oft verzweigt. Die Blätter sind graugrün und zerknittert, sie zerfallen leicht in kleinere Fragmente. Die achsenständigen Blütenstände weisen blassviolett gefärbte Blüten mit röhrenförmigem Kelch und zweilippiger Korolla auf.

B. Die Droge wird pulverisiert (355). Das Pulver ist grau-grün. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei Chloralhydrat Lösung R verwendet wird.
Das Pulver zeigt folgende Merkmale:

Epidermiszellen mit Kutikula; Drüsenschuppen mit 4, 6 oder 8 sezernierenden Zellen, 1- 4 zellige Gliederhaare, kleinere Verbände kollenchymatischer Zellen aus den Kanten der Stängel; aus dem Mark parenchymatische Zellen, einzeln oder in kleineren Verbänden, teilweise mit Calciumoxalatnadeln und Calciumoxalatprismen; vereinzelt sind Faserbündel erkennbar.

C. Die Prüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 1,0 g pulverisierte Droge (355) wird 10 Minuten mit 100 mL Methanol R unter Rückfluss bei 65°C extrahiert. Die erhaltene Lösung filtriert, das Filtrat als Testlösung verwendet.

Referenzlösung 1: 2,5 mg Rutin und 2,5 mg Hyperosid werden in 10,0 mL Methanol R gelöst.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel G R

Fließmittel: Wasserfreie Ameisensäure R, Wasser R, Ethylacetat R (15:10:75 V/V/V)

Auftragen: 4 µL [2 µL] Referenzlösung und 10 µL [5 µL] Untersuchungslösung, bandförmig

Laufstrecke: 100 mm [60 mm]

Trocknen: bei 110 °C

Detektion: Die warme Platte wird mit einer Lösung von Diphenylboryloxyethylamin R ($10\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) in Methanol R und anschließend mit einer Lösung von Macrogol 400 R ($50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) in Methanol R besprüht. Die Platte wird etwa 30 min lang an der Luft trocknen gelassen und im ultravioletten Licht bei 366 nm ausgewertet.

Ergebnis: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen von Referenzlösung und Untersuchungslösung ist aus den nachstehenden Angaben ersichtlich. Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können weitere, schwächer fluoreszierende Zonen vorhanden sein.

Oberer Plattenrand	
Hyperosid: gelbe fluoreszierende Bande	Eine gelb fluoreszierende Bande (Hyperosid) Eine gelb fluoreszierende Bande
Rutin: gelbe fluoreszierende Bande	Gelb fluoreszierende Bande (Rutin) Schwach blau fluoreszierende Bande
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): höchstens 5,0 Prozent andere fremde Bestandteile

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 10,0 Prozent, mit 1,000 g pulverisierter Droge (355) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 11,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Stammlösung: In einem 100-ml-Rundkolben wird 1,00 g pulverisierte Droge (355) (2.9.12) mit 1 ml einer Lösung von Methenamin R ($5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), 20 ml Aceton R und 2 ml Salzsäure R1 versetzt. Die Mischung wird 30 min lang unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt. Die Flüssigkeit wird durch einen Wattebausch in einen Kolben filtriert. Der Wattebausch wird zum Rückstand in den Kolben gegeben; zu Extraktion wird 2-mal 10 min lang mit je 20 ml Aceton R unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird jeder Auszug durch den Wattebausch in den Kolben filtriert. Die vereinigten Acetonauszüge werden nach dem Abkühlen durch ein Papierfilter in einen Messkolben filtriert und mit Aceton R unter Waschen des Kolbens und des Papierfilters zu 100,0 ml verdünnt. 20,0 ml dieser Lösung werden in einem Scheidetrichter mit 20 ml Wasser R versetzt, 1-mal mit 15 ml und 3-mal mit je 10 ml Ethylacetat R ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatauszüge werden in einem Scheidetrichter 2-mal mit je 50 ml Wasser R gewaschen, die Auszüge über 10 g wasserfreies Natriumsulfat R in einen Messkolben filtriert und mit Ethylacetat R zu 50,0 ml verdünnt.

Untersuchungslösung: 10,0 ml Stammlösung werden mit 1 ml Aluminiumchlorid-Reagenz R versetzt und mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % R in Methanol R zu 25,0 ml verdünnt.

Kompensationsflüssigkeit: 10,0 ml Stammlösung werden mit einer 5-prozentigen Lösung (V/V) von Essigsäure 99 % R in Methanol R zu 25,0 ml verdünnt.

Nach 30 min wird die Absorption (2.2.25) der Untersuchungslösung bei 425 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit gemessen.

Der Prozentgehalt an Flavonoiden wird als Prozentgehalt an Hyperosid nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m}$$

Die spezifische Absorption $A_{1cm}^{1\%}$ von Hyperosid wird mit 500 angenommen.

A = Absorption bei 425 nm

m = Einwaage der Droge in Gramm

6 Experimenteller Teil

6.1 Drogen

Untersuchungsmaterialien	Charge	Anbieter
<i>Coptis chinensis</i> Rhizom	Ch.-B.:53266126	Fa. Caelo, Hilden
<i>Coptis chinensis</i> Rhizom	Ch.-B.:040801H053	Fa. Herbasin, Hilsdorf
<i>Coptis chinensis</i> Rhizom	Ch.-B.:405051	Fa. PharmaChin, Berlin
<i>Coptis chinensis</i> Rhizom	Ch.-B.:S1736	Fa. CAMAG, Muttentz/Schweiz
<i>Coptis deltoidea</i> Rhizom	Ch.-B.:S1738	Fa. CAMAG, Muttentz/Schweiz
<i>Coptis teeta</i> Rhizom	Ch.-B.:S1737	Fa. CAMAG, Muttentz/Schweiz
<i>Forsythia suspensa</i> Fructus	Ch.-B.:50079035	Fa. Caelo, Hilden
<i>Forsythia suspensa</i> Fructus	Ch.-B.:040801H017	Fa. Herbasin, Hilsdorf
<i>Forsythia suspensa</i> Fructus	Ch.-B.:405051	Fa. PharmaChin, Berlin
<i>Forsythia suspensa</i> Fructus	Ch.-B.:L-5298	Fa. Complemedis, Schönwerd/Schweiz
<i>Astragalus membranaceus</i> Radix	Ch.-B.:50807085	Fa. Caelo, Hilden
<i>Astragalus membranaceus</i> Radix	Ch.-B.:M1202501	Fa. Complemedis, Schönwerd/Schweiz
<i>Astragalus membranaceus</i> Radix	ohne Angabe	LfL, Freising
<i>Astragalus membranaceus</i> Radix	Ch.-B.:050801H004	Fa. Herbasin, Hilsdorf
<i>Astragalus membranaceus</i> Radix	Ch.-B.:405051	Fa. PharmaChin, Berlin

6.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Analytische Waage: Research R 160	Fa. Satorius, Göttingen
AS 30 Auftragegerät (DC/HPTLC-Auftragegerät)	Fa. Desaga/Sahrstedt Gruppe, Nümbrecht
ASE (Accelerated Solvent Extractor), Extraktionsgerät	Fa. Dionex, Germering
CabUVis, Videodokumentation	Fa. Desaga/Sahrstedt Gruppe, Nümbrecht
Centrifuge Hermle Z 346	Fa. Kontron, Neufahrn
CX21, Mikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
Doppeltrogkammer (100x100 mm) (DC/HPTLC)	Fa. CAMAG, Muttentz, Schweiz
Doppeltrogkammer (200x100 mm) (DC/HPTLC)	Fa. CAMAG, Muttentz, Schweiz
Doppeltrogkammer (200x200 mm) (DC/HPTLC)	Fa. CAMAG, Muttentz, Schweiz
DS 20, Derivatisierungsgerät (DC/HPTLC)	Fa. Desaga/Sahrstedt Gruppe, Nümbrecht
ADC2 Entwicklungskammer (DC/HPTLC)	Fa. CAMAG, Muttentz, Schweiz
Flachbodenkammer für mehrere Platten (200x200 mm)	Fa. Desaga/Sahrstedt Gruppe, Nümbrecht
HPLC-Anlage: Elite La Chrom mit:	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt
Pumpe L-2130	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt
Autosampler L-2200	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt
Diode Array Detector L-2455	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt

Column Oven L-2350	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt
Software EZChrom Elite	Fa. VWR Hitachi, Darmstadt
HPTLC-Tauchgerät	Universität Regensburg
inoLab pH Level 1, pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Labormühle ZM1	Fa. Retsch, Haan
Laborota 4003, Rotationsverdampfer	Fa. Heidolph, Schwabach
Laborwaage MC 1b laboratory	Fa. Satorius, Göttingen
Linomat 5 (DC/HPTLC-Auftragegerät)	Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz
Milli Q UF plus, Wasseraufbereitung	Fa. Millipore, Eschborn
Muffelofen, Nabertherm	Fa. Naber, Lilienthal, Bremen
Nanomat (DC/HPTLC-Auftragegerät)	Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz
Perkolationsrohr ID: 15mm, l: 200mm	Universität Regensburg
ReproStar, Fotokammer	Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz
Sonorex Super RK 255 H, Ultraschallbad	Fa. Bandelin, Berlin
Tauchkammer	Universität Regensburg
Thermoplatte S, Heizplatte	Fa. Desaga/Sahrstedt Gruppe, Nümbrecht
Tischmühle IKB A 10	Fa. Retsch, Haan
U-Pot, Polarisationsfilter	Fa. Olympus, Hamburg
WF10xMicro, Okularmikrometer	Fa. Olympus, Hamburg

6.3 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Firma
Aceton	p.A.	Fa. Merck
Acetonitril	LiChrosolv (HPLC-rein)	Fa. Merck
Ameisensäure	p.A.	Fa. Merck
Diethylamin	Rectapur	Fa. VWR
Eisessig	p.A.	Fa. Merck
Ethylacetat	p.A.	Fa. Acros
Methanol	p.A.	Fa. Merck
Salzsäure	p.A.	Fa. Merck
Schwefelsäure	p.A.	Fa. Merck
Toluol	p.A.	Fa. Merck
Trichlormethan	p.A.	Fa. Merck
Wasser	reinst	hausintern
Methanol	LiChrosolv (HPLC-rein)	Fa. Merck

6.4 Referenzsubstanzen

Substanz	Reinheit	Herkunft
Arctiin	DC-rein	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Astragalosid I	HPLC-rein	Prof. Ihsan Calis, Universität Hacettepe, Türkei
Astragalosid II	HPLC-rein	Prof. Ihsan Calis, Universität Hacettepe, Türkei

Astragalosid IV	HPLC-rein	Prof. Ihsan Calis, Universität Hacettepe, Türkei
Astragalosid VI	HPLC-rein	Prof. Ihsan Calis, Universität Hacettepe, Türkei
Astragalosid VII	HPLC-rein	Prof. Ihsan Calis, Universität Hacettepe, Türkei
Berberin	PhytoProof	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Epiberberin	HPLC-rein	Universität Regensburg
Coptisin	PhytoProof	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Daidzin	DC-rein	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Forsythosid A	PhytoProof	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Jatrorrhizin	PhytoProof	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Palmatin	PhytoProof	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Phillyrin	DC-rein	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Pinoresinol	DC-rein	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth
Salidroside	DC-rein	Fa. Phytolab, Vestenbergskreuth

6.5 Materialien

Produkt	Herkunft
DC-Alufolien 200x200 mm Kieselgel 60 F 254	Fa. Merck/VWR
HPTLC-Glasplatten 200x100 mm Kieselgel 60 F 254	Fa. Merck/VWR
HPTLC-Glasplatten 100x100 mm Kieselgel 60 F 254	Fa. Merck/VWR
S&S Faltenfilter 900 mm	Fa. Schleicher & Schüll, Dassel
Seesand	Fa. Merck/VWR
200x100 mm HPTLC Glasplatten Nano-Sil-20 UV254	Fa. Machery-Nagel
Membranfilter, Probenfiltration HPLC	

6.6 Methoden

6.6.1 Bestimmung der Asche

Ein Quarztiegel wurde 30 Minuten lang zur Rotglut erhitzt, im Exsikkator erkalten gelassen und gewogen. 1,00 g gepulverte Droge, die durch ein Sieb der Größe 355 gesiebt worden ist, wurde gleichmäßig in dem Tiegel verteilt und im Muffelofen bei 600 ± 25 °C bis zur Massekonstanz geglüht, wobei der Tiegel nach jedem Glühen im Exsikkator erkalten gelassen wurde. Die Substanz darf während der Bestimmung nicht entflammen. Wenn die Asche nach längerem Glühen noch schwarze Teile enthielt, wurde über ein aschefreies Filter filtriert und der Rückstand samt Filter erneut geglüht. Das Filtrat wurde mit der Asche vereinigt, die Mischung vorsichtig zur Trockene eingedampft und der Rückstand bis zur Massekonstanz geglüht.

Methode in Anlehnung an die Ph. Eur. 6.0/2.04.16.00

6.6.2 Bestimmung des Trocknungsverlusts

Der Trocknungsverlust ist der in Prozent (m/m) angegebene Masseverlust.

Ausführung: 1,0 g gepulverte Droge, die durch ein Sieb der Größe 355 gesiebt worden ist, wurde in ein gewogenes Wägegglas, das zuvor bei 105°C getrocknet wurde, eingewogen. Die Substanz wurde 1 Stunde bei 105°C getrocknet. Die Trocknung fand in einem Trockenschrank statt.

Methode in Anlehnung an die Ph. Eur. 6.0/2.02.32.00

6.6.3 Bestimmung des Geruchs

Auf ein Uhrglas von 80 mm Durchmesser wurden 0,5 bis 2,0 g Droge in dünner Schicht ausgebreitet.

Nach 15 Minuten wurde der Geruch bestimmt oder die Abwesenheit eines solchen festgestellt.

Methode in Anlehnung an die Ph. Eur. 6.0/2.03.04.00

6.6.4 Methodik für die HPTLC

Plattenmaterial: Die Platten wurden mit äußerster Sorgfalt behandelt, um jegliche Beschädigung der Oberfläche zu vermeiden. Die Platten wurden in der Originalverpackung bei geschlossenem Deckel gelagert. Die Platten wurden erst kurz vor der Benutzung aus der Verpackung genommen. Generell wurden die Platten nur an dem oberen Ende angefasst, um Verunreinigungen zu vermeiden. Wenn keine anderen Platten notwendig waren, wurden „Merck HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten“ mit dem Format 100x100 mm oder 200x100 mm verwendet. Für die meisten Analysen war eine Vorbehandlung der Platten nicht notwendig, es sei denn es traten Verunreinigungen während der Entwicklung von Chromatogrammen in Form von „Schmutzbanden“ auf. Bei dem Auftreten solcher „Schmutzbanden“, bei Wiederholbarkeits-Analysen und quantitativen Analysen wurden die Platten vor dem Auftragen nach folgendem Modus gewaschen: Die Entwicklungsrichtung wurden mit einem Bleistift am oberen Plattenrand markiert. Die Platte wurde mit 20 ml Methanol in einer 200x100 mm Doppeltrogkammer (TTC) bis zum oberen Ende entwickelt. In einer Kammer konnten zwei 200x100 mm-Platten oder vier 100x100 mm-Platten entwickelt werden. Nach dem Entwickeln wurden die Platten für 20 min in einem sauberen Trockenschrank bei 120°C getrocknet. Die Platten wurden in einem geeigneten Behältnis (Exsikkator) mit der Laboratmosphäre äquilibriert.

Probenauftragung: Die Probenauftragung erfolgte sofern nicht anders notwendig mit einem Sprühverfahren. Im Fall einer punktförmigen Auftragung wurde der Nanomat 4 zu verwendet. Es wurden folgende Auftrageparameter verwendet:

Parameter	HPTLC
Abstand vom unteren Ende der Platte	10 mm
Minimaler Abstand in x-Position der ersten Bande	15 mm
Minimaler Abstand zwischen Banden/Punkten	2 mm
Maximale Anzahl von Banden auf eine 100x100 mm Platte	7
Maximale Anzahl von Banden auf eine 200x100 mm Platte	16
Maximaler Durchmesser eines Auftragepunktes	5 mm
Bandbreite	10 mm

Herstellen und aufbewahren von Fließmitteln: Fließmittel, die aus mehr als einer Komponente bestanden, wurden durch separates abmessen des benötigten Volumens (bzw. Gewicht) jeder Komponente und durch mischen in einem geeignetem Gefäß hergestellt.

Volumen geringer als 1 ml wurden mit einer geeigneten Mikropipette abgemessen, Volumen bis zu 20 ml wurden mit einer Messpipette abgemessen, Volumen größer als 20 ml wurden mit einem graduierten Messzylinder abgemessen. Um Volumenfehler zu minimieren, wurden die Fließmittel so hergestellt, dass sie für einen Tag ausreichten.

Entwicklung: Die Platten wurden in einer gesättigten Doppeltrogkammer nach folgender Vorgehensweise entwickelt: Herstellung des benötigten Fließmittelvolumens (10 ml für 100x100 mm; 20 ml für 200x100 mm). Die hintere Kammer wurde mit einem passendem Stück Filterpapier (100x100 mm; 200x100 mm) ausgekleidet und das Fließmittel so in die Kammer gefüllt, dass das Filterpapier befeuchtet war und an der Glaswand anhaftete. Die Kammer wurde schräg gestellt (ca. 45°), so dass das Fließmittel auf beiden Seiten denselben Pegel besass. Die Kammer wurde auf eine Arbeitsbank gestellt und für 15 Minuten äquilibriert. Die gewünschte Entwicklungsstrecke wurde mit einem Bleistift an der rechten Seite der Platte markiert. Der Kammerdeckel wurde vorsichtig zur Seite geöffnet. Die Platte wurde in den vorderen Trog dem Filterpapier gegenüber gestellt. Der Kammerdeckel wurde geschlossen und die Platte bis zur Markierung entwickelt. Der Deckel wurde abgenommen und die Platte aus der Kammer entfernt. Die Platte wurde für 5 Minuten im Kaltluftstrom getrocknet (und dabei in Richtung der Entwicklung aufgestellt). Nach jeder Entwicklung wurde das verbleibende Fließmittel und das Filterpapier entsorgt. Vor jedem weiteren Lauf wurde die Kammer gereinigt.

Derivatisierung: Die Auftragung von Derivatisierungsreagenz erfolgte durch tauchen oder sprühen. Sprühen von Derivatisierungsreagenz erfolgte in einem Sprühkabinett. Beinhaltet die Derivatisierung ein Erhitzen der Platte, wurde ein Plattenheizer verwendet.

Tauchen: Die Tauchkammer wurde mit 100 ml Reagenz gefüllt. Der Plattenhalter wurde an der Platte befestigt, der Startknopf gedrückt und eine ausreichend lange Zeit in die Lösung eingetaucht. Überschüssiges Reagenz konnte abgetropfen und die Rückseite der Platte mit einem Papiertuch gereinigt. Nachdem Entfernen der Platte von dem Plattenhalter wurde die Platte unter Kaltluftstrom getrocknet (vertikal zur Chromatographierichtung).

Sprühen (Glassprühgerät):

Die Flasche des Sprüherers wurde mit 50 ml Derivatisierungsreagenz gefüllt. Die Platte wurde in einem Sprühkabinett gegen ein Papiertuch gestellt. Danach wurde die Platte horizontal von links oben nach rechts unten und vertikal von rechts unten nach links oben gleichmäßig besprüht und unter Kaltluftstrom getrocknet.

Erhitzen: Nach Einschalten der Platte und Einstellung der gewünschten Temperatur wurde bis zum Erreichen der gewählten Temperatur gewartet. Die Platte wurde mit dem Rücken nach unten auf die Heizplatte gelegt und nach der durch die Methode festgelegten Zeit vom Heizer entfernt.

Dokumentation der Platten: Jede entwickelte Platte wurde mit einem elektronischen Dokumentationssystem bei UV 254 nm, UV 366 nm und bei Tageslicht dokumentiert.

Wenn ein Lichttyp keine dokumentationsrelevanten Informationen geliefert hatte, wurde dies dokumentiert. Bei zu derivatisierenden Platten wurden Bilder vor und nach der Derivatisierung angefertigt.

Beschriftung der Platten: Jede Platte wurde mit einer individuellen Identifizierungsnummer (ID) versehen, und diese mit einem Bleistift in die obere rechte Ecke geschrieben. Die ID beinhaltet das Projekt, „Strich unten“, das Jahr(JJ), den Monat (MM), den Tag (TT), „Strich unten“ und die fortlaufende Plattennummer je Tag.

Beispiel: Projekt Coptis am 23. Januar 2007 die vierte Platte des Tages: Coptis_070223_04

Bilder: Elektronische Bilder wurden als Teil der Dokumentation für jedes Bild mit ProViDoc gespeichert und als pdf-Datei in die Projekt Arbeitsblätter eingetragen. Diese Bilder wurden analog der Bezeichnung der Platten gekennzeichnet, z.B. Projekt Coptis am 23. Januar 2007 die vierte Platte des Tages aufgenommen unter 254 nm:

Coptis_070223_04_254

Folgende Abkürzungen wurden benutzt:

254	Kurzwellen-UV-Licht, Reflektion
366	Langwellen UV-Licht, Reflektion
W	Weißlicht (Reflektion)
WT	Weißlicht (Transmission)
WRT	Weißlicht (Reflektion/ Transmission)
A	Anisaldehyd-Reagenz

S Schwefelsäure-Reagenz

NR Naturstoffreagenz

NRP Naturstoffreagenz, nachfolgend Polyethylenglykol

Um andere Reagenzien zu spezifizieren wurden andere Buchstaben auf den Projekt Arbeitsblättern vermerkt.

Dokumentation der Arbeit: Die durchgeführten Arbeiten wurden auf einem Projekt Arbeitsblatt dokumentiert.

6.6.5 Validierungsprotokoll für die HPTLC-Drogenidentifizierung

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Validierungsprotokolle ausgearbeitet, die die Vorgehensweise bei der Validierung detailliert beschreiben. Im Folgenden wird nur ein Validierungsprotokoll dargestellt. Die Validierungsergebnisse wurden in der Struktur des Validierungsprotokolls dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse wurden in die Protokollstruktur eingefügt und die Akzeptanzkriterien mit Hilfe von Chromatogrammbildungen und Auswertetabellen mit Ja-/ Nein-Aussagen bewertet.

6.6.5.1 Überschrift des Validierungsprotokolls

6.6.5.2 Zielsetzung der zu validierenden Methode:

Die Methode für die Identifizierung von [Platzhalter für die Pflanzenspezies] durch HPTLC-Fingerprint ist geeignet die Identität einer gegebenen Probe von Pflanzenmaterial als [Platzhalter für die Pflanzenspezies] zu identifizieren.

6.6.5.3 Allgemeine Freigabekriterien:

Die Methode führt zu validen Ergebnissen wenn:

Eine authentische Pflanzenprobe von [Platzhalter für die Pflanzenspezies] zu einem Fingerprint-Chromatogramm führt, die denselben chromatographischen Fingerprint liefert wie unter Punkt 6.6.5.4.10 der Methode, vor allem in Bezug auf Anzahl, Position und Farbe und alle Freigabekriterien erfüllt, die unter den Punkten 6.6.5.5.2 bis 6.6.5.5.6 genannt sind und alle Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen nicht über den Abweichungen die unter Punkt 6.6.5.5.4 bis 6.6.5.5.6 angegeben sind. Eventuelle Abweichungen vom Protokoll müssen schlüssig erklärt werden können.

6.6.5.4 Methodenbeschreibung

6.6.5.4.1 Herstellen der Testlösung

Beschreiben der Extraktions- und Aufarbeitungsmethodik der Testlösung

6.6.5.4.2 Herstellen der Referenzlösungen

Authentisches Drogenmaterial: wie unter Punkt 6.6.5.4.1

Verdünnungen der Referenzlösungen mit Einwaage und Lösungsmittel

6.6.5.4.3 Herstellen der Derivatisierungsreagenzien

Beschreibung der Herstellung der Derivatisierungsreagenzien

6.6.5.4.4 Stationäre Phase

Angabe der verwendeten DC/HPTLC-Platten.

6.6.5.4.5 Probenauftragung

Beschreibung des Auftragemodus von Test- und Referenzlösungen.

6.6.5.4.6 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Beleg für die Temperatur und die Luftfeuchte im Labor.

6.6.5.4.7 Chromatographie

Angabe über den verwendeten Kammertyp: Doppeltrogkammer (TTC), Flachbodenkammer (FBC); Format der Kammer: 100x100 mm, 100x200 mm, Automatische Entwicklungskammer 2 (ADC 2); Konfiguration: mit Kammersättigung und wie lange, ohne Kammersättigung, Kontrolle der Luftfeuchte mit der ADC 2; Angabe des Fließmittels mit Volumenanteilen der einzelnen Komponenten; Angabe der Entwicklungsstrecke ab Auftragezone; durchführen der Trocknung der Platte nach Entwicklung.

6.6.5.4.8 Derivatisierung

Wenn eine Derivatisierung durchgeführt wurde, Angabe des Derivatisierungsreagenz mit Anwendungsmodus: Besprühen oder tauchen der entwickelten DC/HPTLC's.

6.6.5.4.9 Dokumentation

Vor der Derivatisierung bei UV 254 nm, vor der Derivatisierung bei UV 366 nm, nach der Derivatisierung bei Tageslicht, nach der Derivatisierung bei UV 366 nm, je nach Notwendigkeit.

6.6.5.4.10 Abbildungen der Chromatogramme

Abbildung der entwickelten Chromatogramme bei den entsprechenden Wellenlängen, vor und nach der Derivatisierung, wenn diese für die Auswertung notwendig sind. Angaben zur Bahnzuordnung.

6.6.5.4.11 Auswertung der Ergebnisse

Beschreibung des Fingerprints der Testlösung, vergleichen der aufgetragenen Referenzsubstanzen und der authentischen Drogenreferenz mit dem Fingerprint der Testlösung. Bewertung der Methode bezüglich ihrer Eignung für die Identifizierung des Pflanzenmaterials das für die Herstellung der Testlösung verwendet wurde. Tabellarische Ausstellung von charakteristischen Banden im DC/HPTLC mit Bezeichnung und Retentionsfaktor (R_f)

6.6.5.4.12 Methodeneignungstest

Angabe der Banden die im DC/HPTLC erkennbar sein müssen.

6.6.5.5 Validierung

6.6.5.5.1 Materialien

6.6.5.5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Angabe der Chemikalien und Lösungsmittel mit Hersteller und Chargennummer.

6.6.5.5.1.2 Pflanzenproben

Verwendete Pflanzenproben und Referenzsubstanzen mit Anbieter Angabe.

6.6.5.5.1.3 Platten

Verwendete DC/HPTLC-Platten mit Anbieter und Chargen Angabe.

6.6.5.5.1.4 Geräte

Verwendete Geräte.

6.6.5.5.1.5 Software

Verwendete Software

6.6.5.5.2 Stabilität

6.6.5.5.2.1 Stabilität der Analyten während der Chromatographie

Beschreibung des Experiments: Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben extrahiert. [Platzhalter für das Auftragevolumen] werden punktförmig an dem rechten unteren Plattenecke einer 100x100 mm Platte (10 mm von jedem Ende) aufgetragen. Die Platte wird entwickelt und getrocknet wie unter Punkt 6.6.5.4.6 und 6.6.5.4.7 beschrieben. Nach der ersten Entwicklung wird die Platte um 90° nach rechts gedreht und nochmals wie unter Punkt 6.6.5.4.6 und 6.6.5.4.7 beschrieben mit frischem Fließmittel entwickelt. Die Platte wird derivatisiert (wenn notwendig) und dokumentiert wie unter Punkt 6.6.5.4.8 und 6.6.5.4.9 beschrieben. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Probe ist stabil während der Chromatographie wenn alle auftretenden Zonen auf der Winkelhalbierenden liegen.

6.6.5.5.2.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Beschreibung des Experiments: Die Lösung einer authentischen Drogenprobe wird wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben extrahiert. [Platzhalter für das Auftragevolumen] dieser Lösung wird wie unter Punkt 6.6.5.4.4 und 6.6.5.4.5 beschrieben auf eine 100x100 mm Platte aufgetragen. Die Probe und die Platte mit der aufgetragenen Lösung werden beiseite gestellt (die Platte mit Aluminiumfolie umwickeln oder in einen Exsikkator stellen). Nach 3 Stunden wird eine weitere Probe der authentischen Drogenprobe extrahiert (wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben). Es werden 2 weitere Banden je [Platzhalter für das Auftragevolumen] von der

frisch hergestellten Lösung auf die beiseite gestellte Platte aufgetragen und eine vierte Bande mit [Platzhalter für das Auftragevolumen] der vor 3 Stunden hergestellten Lösung aufgetragen. Es ergibt sich folgendes Auftrage Schema für die Proben:

- (A) Probe, aufgetragen 3 Stunden vor der Chromatographie
- (B) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- (C) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- (D) Probe, 3 Stunden (in Lösung) vor der Chromatographie extrahiert

Die Platte wird wie unter Punkt 6.6.5.4.6 bis 6.6.5.4.9 beschrieben behandelt.

Kriterium für die Akzeptierung des Tests:

Die Probe ist mindestens 2 Stunden in Lösung und 3 Stunden auf der Platte stabil, wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Banden Intensität, Farbe und der R_f -Werte ergeben.

6.6.5.5.2.2.1 Stabilität der Derivatisierung/ Ergebnisse

Beschreibung des Experiments: Die authentische Drogenprobenlösung wird wie unter den Punkten 6.6.5.4.4 bis 6.6.5.4.8 beschrieben chromatographiert. Nach der Dokumentation nach Punkt 6.6.5.4.9 wird die Platte eine Stunde beobachtet. Nach 0, 5, 30 Minuten und nach 1 Stunde wird jeweils ein Bild der Platte dokumentiert. Die Bilder werden optisch verglichen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die/das Derivatisierung/ Ergebnis ist stabil, wenn sich in 30 Minuten keine signifikanten Veränderungen der Banden ergeben.

6.6.5.5.3 Spezifität

6.6.5.5.3.1 Identifizierung von [Platzhalter für die Pflanzenspezies] Proben durch vergleichen von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen.

Beschreibung des Experiments: Die Testlösung wird wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben hergestellt. Die Referenzsubstanzen werden wie unter Punkt 6.6.5.4.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden auf eine Platte aufgetragen wie unter Punkt 6.6.5.4.5 beschrieben. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.6 und 6.6.5.4.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 6.6.5.4.10 verglichen. Kriterien für die Akzeptierung des Tests: Die Methode ist spezifisch wenn das erhaltene Fingerprint-Chromatogramm folgende [Platzhalter für die Banden die vorhanden sein müssen] bei der Auswertung im [Platzhalter für den Auswertemodus] nach Derivatisierung [wenn notwendig]

erkennbar sind: Vergleich des Fingerprints der Testlösungen mit denen der authentischen Pflanzenprobe, die auch in dem Chromatogramm unter Punkt 6.6.5.4.10 zu sehen sind und sich in ihrer Anzahl, Position, Farbe und Intensität entsprechen.

6.6.5.5.3.2 Detektion von Verfälschungen

Beschreibung des Experiments: Verfälschungen werden extrahiert wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben. Die Lösungen der authentischen Drogenproben und die Referenzsubstanzen werden wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden wie unter Punkt 6.6.5.4.5 beschrieben auf eine Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.6 und 6.6.5.4.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt wie unter Punkt 6.6.5.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 6.6.5.4.10 verglichen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Methode ist für [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] spezifisch, wenn das Fingerprint-Chromatogramm der Verfälschung [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] signifikant unterschiedlich ist zu dem Fingerprint-Chromatogramm der authentischen Droge von [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] bezüglich der Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Banden.

6.6.5.5.4 Wiederholpräzision

Beschreibung des Experiments: Drei Proben der authentischen Drogenproben werden einzeln wie unter Punkt 6.6.5.4.1 beschrieben extrahiert. Auf drei 200x100 mm Platten werden je ein aliquoter Teil [*Platzhalter für das Auftragevolumen*] der Extrakte wie unter Punkt 6.6.5.4.5 beschrieben aufgetragen. Die Platten werden wie unter Punkt 6.6.5.4.6 und 6.6.5.4.7 beschrieben chromatographiert. Es wird dieselbe Kammer verwendet, aber mit frischem Fließmittel und frischem Filterpapier. Die Platten werden derivatisiert und dokumentiert wie unter Punkt 6.6.5.4.8 und 6.6.5.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse innerhalb jeder Platte und von Platte zu Platte werden ausgewertet. Die Durchschnitts- R_f -Werte der unter Punkt 6.6.5.4.11 festgelegten Bahnen werden für jede Bahn und jede Platte bestimmt. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Wiederholpräzision der Methode ist akzeptierbar unter folgenden Bedingungen: Alle Banden sind für jede Platte in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität identisch. Die Banden auf der Platte verlaufen parallel und ohne Störungen (Kurven oder Wellen). Die R_f -Werte der festgelegten korrespondierenden Banden über die drei Platten weichen um nicht mehr als 0,03 R_f -Einheiten voneinander ab.

6.6.5.5.5 Laborpräzision

Beschreibung des Experiments: Das unter Punkt 6.6.5.5.4 beschriebene Experiment wird an 2 weiteren Tagen mit jeweils einer Platte wiederholt. Die Durchschnitts-R_f-Werte der Banden werden für jede Bahn und jede Platte bestimmt und die Abweichungen von Platte zu Platte ausgewertet. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Zwischenpräzision der Methode ist akzeptierbar, wenn die Banden auf der Platte parallel und ohne Störungen (Kurven oder Wellen) verlaufen, und die R_f-Werte der korrespondierenden Banden über die drei Platten um nicht mehr als 0,06 R_f-Einheiten voneinander ab weichen.

6.6.5.5.6 Robustheit

6.6.5.5.6.1 Kammertyp/Plattentyp

Beschreibung des Experiments: Die Methode wird mit dem entsprechendem authentischen Drogenmaterial und den Referenzsubstanzen wie unter Punkt 6.6.5.4 beschrieben durchgeführt. Es werden verschiedene Entwicklungskammertypen verglichen. Kriterien für die Akzeptierung des Tests: Alle Banden für die in jeder Kammer entwickelten Platten sind gleich in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Zonen. Die erhaltenen R_f-Werte des Tests sind nicht signifikant unterschiedlich zu denen die unter Punkt 6.6.5.4.10 beschrieben sind. Ein Unterschied von nicht größer als 0,06 R_f-Einheiten ist akzeptabel.

6.6.5.5.6.2 Entwicklungsdistanz

Beschreibung des Experiments: Die Methode wird wie unter Punkt 6.6.5.4 beschrieben durchgeführt. Es werden nur die Extrakte der authentischen Drogenprobe und Referenzsubstanzen verwendet. Die Entwicklungsstrecke wird um [*Platzhalter für die Strecke*] mm erhöht, bzw. die Entwicklungsstrecke um [*Platzhalter für die Strecke*] mm erniedrigt. Kriterien für die Akzeptierung des Tests: Die Banden die bei der veränderten Entwicklungsstrecke erhalten werden sind gleich in Bezug auf Anzahl, Position, Farbe und Intensität. Die R_f-Werte bei diesem Test unterscheiden sich nicht signifikant von den Ergebnissen die unter Punkt 6.6.5.4.10 erhalten wurden. Die Abweichung des R_f-Werts darf nicht größer als 0,06 sein.

6.6.6 Validierungsprotokoll für HPTLC

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen sind Validierungsprotokolle ausgearbeitet, die die Vorgehensweise bei der Validierung detailliert beschreiben. Im

Folgendes wird nur ein Validierungsprotokoll dargestellt. Die Validierungsergebnisse werden in der Struktur des Validierungsprotokolls dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse werden in die Protokollstruktur eingefügt und die Akzeptanzkriterien mit Hilfe von Chromatogrammbildungen und Auswertetabellen mit Ja-/ Nein-Aussagen bewertet.

6.6.6.1 Überschrift des Validierungsprotokolls

6.6.6.2 Zielsetzung der zu validierenden Methode:

Die Methode für die Quantifizierung von [*Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz*] in [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] ist geeignet die vorne genannten Inhaltsstoffe zu quantifizieren.

6.6.6.3 Allgemeine Freigabekriterien:

Die Methode führt zu validen Ergebnissen wenn alle Freigabekriterien erfüllt sind, die unter den Punkten 6.6.6.5.2 bis 6.6.6.5.4, 6.6.6.5.9 und 6.6.6.5.13 genannt werden und alle Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen nicht über den Abweichungen liegen, die unter Punkt 6.6.6.5.2, 6.6.6.5.5 und 6.6.6.5.6 angegeben sind.

Eventuelle Abweichungen vom Protokoll müssen schlüssig erklärt werden können.

6.6.6.4 Methodenbeschreibung

6.6.6.4.1 Herstellen der Testlösung

Beschreibung der Herstellung der Testlösung

6.6.6.4.2 Herstellen der Referenzlösungen

Beschreibung der Herstellung der Referenzlösungen

6.6.6.4.3 Herstellen der Derivatisierungsreagenzien

Beschreibung der Herstellung des Derivatisierungsreagenz

6.6.6.4.4 Stationäre Phase

Verwendete stationäre Phase

6.6.6.4.5 Probenauftragung

[*Platzhalter für das Volumen*] µL der Testlösungen und ein entsprechendes Volumen der Kalibrierlösungen die unter Punkt 6.6.6.5.4.1 Messbereich (Range) festgelegt werden. Die Lösungen werden als [*Platzhalter für die Länge*] mm lange Banden, mindestens 2 mm voneinander getrennt, 8 mm vom unteren Ende und mindestens 20 mm vom linken und rechten Rand der Platte entfernt, aufgetragen.

6.6.6.4.6 Temperatur und Luftfeuchtigkeit

Beleg für die Temperatur und die Luftfeuchte im Labor

6.6.6.4.7 Chromatographie

Kammertyp: 200x100 mm Doppeltrogkammer in Automatischer Entwicklungskammer 2 (ADC 2); Konfiguration: Gesättigt für 10 min (Filterpapier mit Fließmittel befeuchtet in der Kammer gegenüber der Platte); Fließmittel: [*Platzhalter für das Fließmittel mit Volumenanteilen*]; Entwicklungstrecke: [*Platzhalter für die Entwicklungstrecke*] mm vom unteren Ende der Platte; Trocknen: 10 min mit Kaltluft (Fön)

6.6.6.4.8 Derivatisierung

Angabe über Art und Dauer der Derivatisierung

6.6.6.4.9 Dokumentation

Angabe über Wellenlänge bei der dokumentiert wurde

6.6.6.4.10 Bilder des Chromatogramms und des Densitogramms

Bahnzuordnung: Tabelle mit Kennzeichnung der einzelnen Bahnen.

Abbildung: Bild des Chromatogramms bei der Quantifizierungswellenlänge.

Abbildung: Übersichtsdensitogramm der HPTLC-Platte bei der Quantifizierungswellenlänge

6.6.6.4.11 Auswertung der Ergebnisse

Beschreibung des Fingerprints der Testlösung, vergleichen der aufgetragenen Referenzsubstanzen und der authentischen Drogenreferenz mit dem Fingerprint der Testlösung. Bewertung der Methode bezüglich ihrer Eignung für die Identifizierung des Pflanzenmaterials das für die Herstellung der Testlösung verwendet wurde. Tabellarische Aufstellung von charakteristischen Banden im DC/HPTLC mit Bezeichnung und Retentionsfaktor (R_f)

6.6.6.4.12 Methodeneignungstest

Angabe der Banden die im DC/HPTLC erkennbar sein müssen.

6.6.6.5 Validierung

6.6.6.5.1 Materialien

6.6.6.5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Angabe der Chemikalien und Lösungsmittel mit Hersteller und Chargennummer

6.6.6.5.1.2 Pflanzenproben

Verwendeten Pflanzenproben und Referenzsubstanzen mit Anbieter Angabe

6.6.6.5.1.3 Platten

Verwendete DC/HPTLC-Platten mit Anbieter und Chargen Angabe

6.6.6.5.1.4 Geräte

Verwendete Geräte

6.6.6.5.1.5 Software

Verwendete Software

6.6.6.5.1.6 Geräteeinstellung

Scanner: Tabelle mit den Scannereinstellungen für die Quantifizierung.

Linomat 5: Angabe der Einstellungsparameter des Auftragegeräts Linomat 5.

6.6.6.5.2 Stabilität

6.6.6.5.2.1 Stabilität der Analyten während der Chromatographie

Beschreibung des Experiments: Eine authentische Probe wird wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben extrahiert. 1 µL werden punktförmig an dem rechten unteren Plattenecke einer 100x100 mm Platte (10 mm von jedem Ende) aufgetragen. Die Platte wird entwickelt und getrocknet wie unter Punkt 6.6.6.4.6 und 6.6.6.4.7 beschrieben. Nach der ersten Entwicklung wird die Platte um 90° nach rechts gedreht und nochmals wie unter Punkt 6.6.6.4.6 und 6.6.6.4.7 beschrieben mit frischem Fließmittel entwickelt. Die Platte wird derivatisiert und dokumentiert wie unter Punkt 6.6.6.4.8 und 6.6.6.4.9 beschrieben. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Probe ist stabil während der Chromatographie, wenn alle Zonen auf der Winkelhalbierenden liegen.

6.6.6.5.2.2 Stabilität der Analyten in Lösung und auf der Platte

Beschreibung des Experiments: Die Lösung einer authentischen Drogenprobe wird wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben extrahiert. [Platzhalter für das Volumen] µL dieser Lösung werden wie unter Punkt 6.6.6.4.4 und 6.6.6.4.5 beschrieben auf eine 200x100 mm Platte aufgetragen. Die Probe und die Platte mit der aufgetragenen Lösung werden beiseite gestellt (die Platte mit Aluminiumfolie umwickeln oder in einen Exsikkator stellen). Nach 3 Stunden wird eine weitere Probe der authentischen Drogenprobe extrahiert (wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben). Es werden 2 weitere Banden je [Platzhalter für das Volumen] µL von der frisch hergestellten Lösung auf die beiseite gestellte Platte aufgetragen und eine vierte Bande mit [Platzhalter für das Volumen] µL der vor 3 Stunden hergestellten Lösung aufgetragen. Es ergibt sich folgendes Auftrageschema für die Proben:

- (A) Probe, aufgetragen 3 Stunden vor der Chromatographie
- (B) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- (C) frische Probe, aufgetragen kurz vor der Chromatographie
- (D) Probe, 3 Stunden (in Lösung) vor der Chromatographie extrahiert

Die Platte wird wie unter Punkt 6.6.6.4.6 bis 6.6.6.4.9 beschrieben behandelt.

Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Probe ist mindestens 2 Stunden in Lösung und 3 Stunden auf der Platte stabil, wenn sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Banden Intensität, Farbe und der R_f-Werte ergeben. Die Banden werden optisch und mit Hilfe der Densitogramme verglichen.

6.6.6.5.2.3 Stabilität der Derivatisierung/ Ergebnisse

Beschreibung des Experiments: Die authentische Drogenprobenlösung wird wie unter den Punkten 6.6.6.4.4 bis 6.6.6.4.8 beschrieben chromatographiert. Nach der Dokumentation nach Punkt 6.6.6.4.9 wird die Platte eine Stunde beobachtet. Nach 0, 5, 30 Minuten und nach 1 Stunde wird jeweils ein Bild der Platte dokumentiert. Die Bilder werden optisch und mit Hilfe der Densitogramme verglichen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Das Ergebnis ist stabil, wenn sich keine signifikanten Veränderungen der Banden in 30 min ergeben.

6.6.6.5.3 Spezifität

6.6.6.5.3.1 Identifizierung von [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] durch vergleichen von authentischen Drogenproben mit Referenzsubstanzen

Beschreibung des Experiments: Die Testlösung wird wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben hergestellt. Die Referenzsubstanzen werden wie unter Punkt 6.6.6.4.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden wie unter Punkt 6.6.6.4.5 beschrieben auf eine Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.6 und 6.6.6.4.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 6.6.6.4.10 verglichen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Methode ist spezifisch, wenn das erhaltene Fingerprint-Chromatogramm folgende Banden zeigt: [*Platzhalter für die Banden die vorhanden sein müssen*], die auch in dem Chromatogramm unter Punkt 6.6.6.4.1 zu sehen sind und in ihrer Anzahl, Position, Farbe und Intensität entsprechen.

6.6.6.5.3.2 Detektion von Verfälschungen

Beschreibung des Experiments: Verfälschungen werden extrahiert wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben. Die Lösungen der authentischen Drogenproben und die Referenzsubstanzen werden wie unter Punkt 6.6.6.4.2 beschrieben hergestellt. Alle Lösungen werden wie unter Punkt 6.6.6.4.5 beschrieben auf eine Platte aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.6 und 6.6.6.4.7 beschrieben, die Derivatisierung erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.8 beschrieben, die Dokumentation erfolgt wie unter Punkt 6.6.6.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse der Chromatographie werden mit denen aus Punkt 6.6.6.4.10 verglichen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Methode ist für [*Platzhalter für zu untersuchende Pflanzenspezies*] spezifisch, wenn das Fingerprint-Chromatogramm der

Verfälschungen [*Platzhalter für mögliche Verfälschungen und/oder Verunreinigungen*] signifikant unterschiedlich ist zu dem Fingerprint-Chromatogramm der authentischen Droge [*Platzhalter für die zu untersuchende Pflanzenspezies*] bezüglich der Anzahl, Position, Farbe und Intensität der Banden.

6.6.6.5.4 Kalibrierung

6.6.6.5.4.1 Messbereich (Range)

Für die Quantifizierung von [*Platzhalter für die zu quantifizierenden Substanzen*] in Proben von [*Platzhalter für die zu untersuchende Pflanzenspezies*] unbekannten Gehalts muss der Messbereich festgelegt werden. Vorversuch: Die Untersuchungslösungen werden wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben hergestellt. Auf eine HPTLC-Platte werden die Testlösungen und Referenzsubstanzenlösungen aufgetragen. Es wird angenommen, dass sich das Detektorsignal und die aufgetragenen Proben-/ Referenzmengen proportional verhalten. Die HPTLC-Platte wird wie unter Punkt 6.6.6.4.7 beschrieben entwickelt. Die Platte wird wie unter Punkt 6.6.6.4.9 beschrieben dokumentiert. Festlegen des Messbereichs: Aus den vermessenen Kalibrierlösungen wird durch auftragen der Konzentration gegen die Signalfäche eine Hilfskalibriergerade erstellt. Aus den einzelnen Messungen der Testlösungen wird der Mittelwert gebildet. Der Messbereich wird als: Mittelwert \pm 50 %, als 50-150% des Mittelwerts festgelegt. Es werden entsprechende 6 verschiedene (äquidistant) Konzentrationen der Kalibrierlösungen (Mischung der einzelnen Referenzsubstanzen) auf eine weitere Platte aufgetragen und mit den Lösungen der Untersuchungslösungen vermessen. Wenn sich die Probenlösungen nicht in diesem Bereich befinden, muss der Messbereich angepasst werden. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Proben müssen sich innerhalb des Messbereichs befinden.

6.6.6.5.4.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des Kalibriersystems das unter Punkt 6.6.6.5.4.1 entwickelt wurde, wird die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür werden auf einer HPTLC-Platte jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen aufgetragen.

Die Berechnung der Varianzen erfolgt mit folgender Gleichung:

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N-1}$$

Formel 1

s^2	Varianz der Fluoreszenzwerte
y_i	Fluoreszenzwerte der Lösungen 1-6
\bar{y}	Mittelwert der Fluoreszenz
N	Anzahl der Messwerte (6)

Die Prüfgröße wird dann mit folgender Gleichung berechnet:

$$PG = \frac{(s_1)^2}{(s_2)^2} \left[(s_1)^2 > (s_2)^2; PG \geq 1 \right]$$

Formel 2

Der Wert aus der F-Tabelle ist mit F (P=99%, f1, f2) zu entnehmen und mit der Prüfgröße PG zu vergleichen. Ergibt sich für die Prüfgröße PG ein Wert größer als der F-Wert, ist der Varianzunterschied signifikant und die Varianzen inhomogen und der Arbeitsbereich muss angepasst werden. Die Konzentrationen werden angepasst und die Signale der neuen Lösungen gemessen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Prüfgröße (PG) muss kleiner sein als der tabellierte F-Wert.

6.6.6.5.5 Wiederholpräzision

Beschreibung des Experiments: Auf Grundlage der Ergebnisse der Untersuchungen unter Punkt 6.6.6.5.4 Kalibrierung werden 3 Untersuchungslösungen je Drogenprobe hergestellt. Auf drei 200x100 mm Platten werden jeweils die Testlösungen und die Kalibrierungslösungen (6 Levels) aufgetragen. Die Kalibrierlösungen werden entsprechend den Ergebnissen der Untersuchungen unter Punkt 6.6.6.5.4.1 mit auf jede Platte aufgetragen. Die Platten werden wie unter Punkt 6.6.6.4.6 und 6.6.6.4.7 beschrieben chromatographiert und mit denselben Geräteeinstellungen wie unter Punkt 6.6.6.5.1.6 vermessen. Es wird dieselbe Kammer verwendet, aber mit frischem Fließmittel und frischem Filterpapier. Die Platten werden dokumentiert wie unter Punkt 6.6.6.4.8 und 6.6.6.4.9 beschrieben. Die Ergebnisse innerhalb jeder Platte und von Platte zu Platte werden ausgewertet. Die Durchschnitts-Gehalte der Zonen werden für jede Bahn und jede Platte auf Grundlage der Kalibrierung bestimmt. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Wiederholpräzision der Methode ist akzeptierbar, wenn der Variationskoeffizient (V_k) $\leq 15\%$ ist.

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$$

Formel 3

s Standardabweichung

\bar{x} Mittelwert der Konzentrationswerte

V_k Variationskoeffizient

6.6.6.5.6 Laborpräzision

Beschreibung des Experiments: Das unter Punkt 6.6.6.5.5 beschriebene Experiment wird an 2 weiteren Tagen mit jeweils einer Platte wiederholt. Die Ergebnisse innerhalb jeder Platte und von Platte zu Platte werden ausgewertet. Die Durchschnitts-Gehalte der Banden werden für jede Bahn und jede Platte auf Grundlage der Kalibrierung bestimmt. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Laborpräzision der Methode ist akzeptierbar, wenn der Variationskoeffizient (V_k) $\leq 15\%$ ist.

6.6.6.5.7 Lineare Regression

Es wird eine Kalibriergerade erstellt aus den Untersuchungen zur Laborpräzision. Die gemessenen Werte jeder Platte für jede aufgetragene Konzentration der Kalibrierlösung werden für jedes „Level“ gemittelt. Für die Berechnung werden die Messwerte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösungen in ein X/Y-Koordinatensystem eingetragen. Es wird eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt.

Diese Gerade wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$y = m \cdot x + b$$

Formel 4

y abhängige Größe, Messwert, z.B. Peakfläche o. Peakhöhe

x unabhängige Größe, Menge der Referenzsubstanz

m Steigung der Geraden

b Ordinatenabschnitt

Für die Berechnung der Kalibriergerade werden die Parameter m und b mit folgenden Gleichungen berechnet:

$$m = \frac{\sum (x_i * y_i) - \left[\frac{\sum y_i * \sum x_i}{N} \right]}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}$$

Formel 5

Der Wert im Zähler wird zusammengefasst als Qxy-Wert:

$$Q_{xy} = \sum (x_i * y_i) - \left[\frac{\sum y_i * \sum x_i}{N} \right]$$

Formel 6

Der Wert im Nenner wird zusammengefasst als Qxx-Wert:

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

Formel 7

Für die Berechnung der Quadratsummen wird der Wert Qyy entsprechend berechnet:

$$Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

Formel 8

Formel 5 wird vereinfacht zu:

$$m = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}}$$

Formel 9

Der Ordinatenabschnitt b berechnet sich mit Formel 10

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Formel 10

Die Mittelwerte \bar{y} und \bar{x} sind die Arbeitsbereichsmitten in Signal- und Konzentrations-/Mengenrichtung. Sie sind mit der Formel 11 und der Formel 10 zu berechnen:

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

Formel 11

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

Formel 12**6.6.6.5.7.1 Reststandardabweichung**

Die Präzision der Kalibriergeraden wird mit der Reststandardabweichung s_y ausgedrückt [3].

Berechnet wird die Reststandardabweichung s_y mit der Formel 13

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (m \cdot x_i + b)]^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{N-2}}$$

Formel 13

- y_i = Signalwert (Fluoreszenz)
 x_i = Konzentrations-/Mengenwert
 m = Steigung der Ausgleichsgeraden

6.6.6.5.7.2 Verfahrensstandardabweichung

Aus der Reststandardabweichung s_y und der Steigung m der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit E) errechnet sich mit Formel 14 die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} .

$$s_{x0} = \frac{s_y}{m}$$

Formel 14**6.6.6.5.7.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}**

Bei der rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird ausgehend von der Verfahrensstandardabweichung mit Formel 15 Bezug auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} genommen.

$$V_{x0} = \frac{s_{x0} \cdot 100\%}{\bar{x}}$$

Formel 15

6.6.6.5.8 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Menge der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine polynomische Kurve berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Mit der allgemeinen Funktionsgleichung einer Parabel kann eine quadratische Regression erfolgen. Diese Kurve wird durch folgende Gleichung (Formel 16) beschrieben:

$$y = nx^2 + mx + b$$

Formel 16

Mit den drei Parametern n, m und b kann eine quadratische Funktion zur Berechnung der Konzentrationen erstellt werden.

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

Formel 17

$$Q_{xy} = \sum (x_i * y_i) - \frac{(\sum x_i * \sum y_i)}{N}$$

Formel 18

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left(\frac{\sum x_i * \sum x_i^2}{N} \right)$$

Formel 19

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \left(\frac{(\sum x_i^2)^2}{N} \right)$$

Formel 20

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 * y_i) - \left(\frac{\sum y_i * \sum x_i^2}{N} \right)$$

Formel 21

Die Berechnung des Wertes n des quadratischen Gliedes erfolgt mit Formel 22:

$$n = \frac{Q_{xy} * Q_{x^3} - Q_{x^2y} * Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} * Q_{x^4}}$$

Formel 22

Die Berechnung des Wertes m des linearen Gliedes erfolgt mit Formel 23:

$$m = \frac{Q_{xy} - n \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

Formel 23

Die Berechnung des konstanten Glieds erfolgt mit Formel 24:

$$b = \frac{(\sum y_i - m \cdot \sum x_i - n \cdot \sum x_i^2)}{Q_{xx}}$$

Formel 24

6.6.6.5.8.1 Reststandardabweichung

Die Reststandardabweichung s_y erfolgt mit Formel 25:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - b \cdot \sum y_i - m \cdot \sum (x_i \cdot y_i) - n \cdot \sum (x_i^2 \cdot y_i)}{N - 3}}$$

Formel 25

6.6.6.5.8.2 Verfahrensstandardabweichung

Die Empfindlichkeit berechnet sich aus der ersten Ableitung der Regression (Formel 26):

$$E = m + 2 \cdot n \cdot \bar{x}$$

Formel 26

Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} errechnet sich nach Gleichung 27:

$$s_{x0} = \frac{s_y}{E}$$

Formel 27

6.6.6.5.8.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} errechnet sich aus Gleichung 28:

$$V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Formel 28

6.6.6.5.9 Varianzprüfung quadratischer und linearer Regression

Für die Überprüfung werden die Reststandardabweichungen der linearen und quadratischen Regression miteinander verglichen

Die Prüfgröße wird dann mit folgender Gleichung berechnet:

$$PG = \frac{(s_{y1})^2}{(s_{y2})^2} [(s_{y1})^2 > (s_{y2})^2; PG \geq 1]$$

Formel 29

Der Wert aus der F-Tabelle ist mit F (P=99%, f1, f2) zu entnehmen und mit der Prüfgröße PG zu vergleichen. Ergibt sich für die Prüfgröße PG ein Wert größer als der F-Wert, ist der Varianzunterschied signifikant und die Varianzen inhomogen und der Arbeitsbereich muss angepasst werden. Akzeptierung des Tests: Ist die Prüfgröße kleiner als der tabellierte Wert in der F-Tabelle ist der Test akzeptiert. Ist die Prüfgröße größer als der tabellierte Wert müssen die Konzentrationen angepasst und die Untersuchungen ab Punkt 6.6.6.5.4 wiederholt werden.

6.6.6.5.10 Kalibrierfunktion

Erstellen der Kalibrierfunktion und den berechneten Parametern b und m nach Formel 4 (Seite 168)

6.6.6.5.11 Korrelationskoeffizient r

Für die Gesamtstreuung der linearen Regression wird noch der Korrelationskoeffizient r berechnet. Die Berechnung wird mit Formel 30 vorgenommen:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 * \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Formel 30

r	Korrelationskoeffizient
x _i	Konzentrationswert
y _i	Signalwert
\bar{y}	Mittelwert der Messpunkte
\bar{x}	Mittelwert der Konzentrationswerte

6.6.6.5.12 Probenauswertung und Prognoseintervall

Mit den Kalibrierfunktionen können die Konzentrationen/Mengen der Substanz [*Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz*] in den unbekannten Proben abgeschätzt werden. Die Kalibrierfunktion Formel 3 (Seite 168) wird nach x umgestellt und die Probenabschätzung kann (mit Formel 31) durchgeführt werden.

$$\hat{x} = \frac{\hat{y} - (m)}{b}$$

Formel 31

\hat{x} berechnete Menge der Substanz X

\hat{y} gemessenes Signal der Substanz X

Für die statistische Bewertung des Gesamtfehlers aus Kalibrierung und Messung der Proben wird eine Berechnung angestellt. Da sich die Fehler aufsummieren und fortpflanzen, liegt die „wahre“ (jedoch unbekannte) Gerade zwischen zwei Hyperbeln [1]. Die beiden Hyperbeln werden mit folgender Gleichung berechnet:

$$y_{u,o} = (m + x + b) \pm s_y \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Q_{xx}}}$$

Formel 32

s_y = Reststandardabweichung, t = t -Faktor der zweiseitigen Tabelle mit $f=N-2$ und $P=95\%$, N = Anzahl der Kalibrierlösungen, \hat{N} (Dach) = Anzahl der Parallelbestimmungen, \hat{x} = Arbeitsbereichsmittel, Q_{xx} = Quadratsumme x

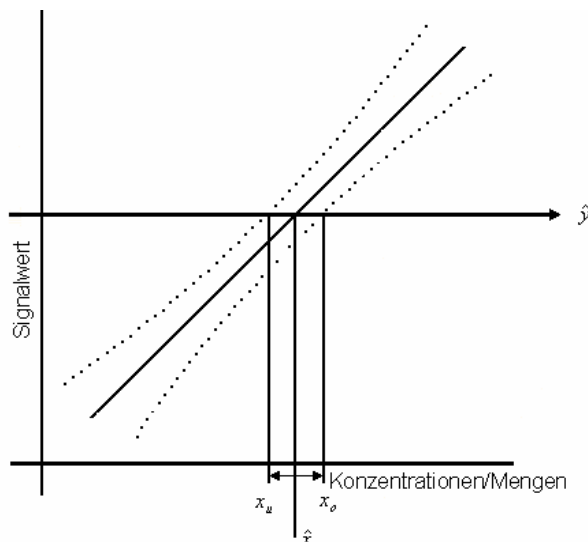


Abb. 116: Graphen für die Bestimmung des Prognoseintervalls

x_o : oberer Grenzwert durch den Schnittpunkt mit dem unteren Prognoseband, x_u : unterer Grenzwert durch den Schnittpunkt mit dem oberen Prognoseband, \hat{x} : Konzentration/Menge der Probe

Aus der Abbildung 116 erschließt sich der Vertrauensbereich/Prognoseintervall (VB) einer Probe: $VB = x_o - \hat{x} = \hat{x} - x_u$

Das Intervall in der sich der Analysenwert „wirklich“ befindet ist somit:

$$\hat{x} \pm VB$$

Die oberen und unteren Werte für die Prognoseintervalle berechnen sich mit folgender Formel:

$$\hat{x}_{u,o} = \frac{\hat{y} - b}{m} \pm \frac{s_y \cdot t}{m} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{m^2 \cdot Q_{xx}}}$$

Formel 33

6.6.6.5.13 Robustheit

Entwicklungsdistanz: Beschreibung des Experiments. Die Methode wird wie unter Punkt 6.6.6.4 beschrieben durchgeführt. Es werden nur die Extrakte der authentischen Drogenprobe und Referenzsubstanzen verwendet. Die Entwicklungstrecke wird auf [Platzhalter für die Distanz] mm erhöht. Die Robustheit der Methode ist akzeptierbar, wenn der Variationskoeffizient (V_i) der Gehaltsbestimmung $\leq 15\%$ ist.

6.6.6.5.14 Wiederfindungsrate

Beschreibung des Experiments: Zu der Einwaage der pulverisierten Droge wird eine bekannte Menge Referenzsubstanz genau gemessen zu gegeben. Die Extraktion der Droge mit der Referenzsubstanz erfolgt ansonsten wie unter Punkt 6.6.6.4.1 beschrieben.

Die Wiederfindung (Formel 34) berechnet sich aus den berechneten Gehalten (BG) und den gemessenen Gehalten (GG)

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \text{GG/BG} \cdot 100\%$$

Formel 34

6.6.6.5.15 Nachweisgrenze

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit folgender Formel

$$DL = \frac{3,3 \cdot s_y}{m}$$

Formel 35

DL	Nachweisgrenze (Detection limit)
s_y	Reststandardabweichung der Kalibriergeraden
m	Steigung der Kalibriergeraden

6.6.6.5.16 Quantifizierungsgrenze

$$QL = \frac{10 \cdot s_y}{m}$$

Formel 36

QL	Quantifizierungsgrenze (Quantification limit)
s_y	Reststandardabweichung der Kalibriergeraden
m	Steigung der Kalibriergeraden

6.6.7 Validierungsprotokoll für die HPLC

Für die HPLC-Untersuchungen sind Validierungsprotokolle ausgearbeitet, die die Vorgehenseise bei der Validierung detailliert beschreiben. Im Folgenden wird ein Validierungsprotokoll dargestellt. Die Ergebnisse werden in die Protokollstruktur eingefügt und Akzeptanzkriterien mit Hilfe von Chromatogrammen und Auswertetabellen durch Ja/Nein Aussagen bewertet.

6.6.7.1 Überschrift des Validierungsprotokolls

6.6.7.2 Zielsetzung der zu validierenden Methode:

Die Methode für die Quantifizierung von *[Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz]* in *[Platzhalter für die Pflanzenspezies]* ist geeignet die vorne genannten Inhaltsstoffe zu quantifizieren.

6.6.7.3 Allgemeine Freigabekriterien

Die Methode führt zu validen Ergebnissen wenn: Alle Freigabekriterien erfüllt werden, die unter den Punkten 6.6.7.5.2, 6.6.7.5.4, 6.6.7.5.4.2 genannt sind und alle Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen nicht über den Abweichungen liegen, die unter Punkt 6.6.7.5.2, 6.6.7.5.5, 6.6.7.5.6 und 6.6.7.5.7 angegeben sind. Eventuelle Abweichungen vom Protokoll schlüssig erklärt werden können.

6.6.7.4 Methodenbeschreibung

6.6.7.4.1 Herstellen der Testlösung

Beschreibung der Herstellung der Testlösung

6.6.7.4.2 Herstellen der Referenzlösungen

Beschreibung der Herstellung der Testlösung

6.6.7.4.3 Stationäre Phase

Bezeichnung der verwendeten stationären Phase mit Säulenmaterial, Korngröße, Säulenlänge und verwendeter Vorsäule.

6.6.7.4.4 Probeninjektionsvolumen

[Platzhalter für das Volumen] µL der Untersuchungslösungen und Kalibrierlösungen. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen werden unter Punkt 6.6.7.5.4.1 Messbereich (Range) festgelegt.

6.6.7.4.5 Chromatographie

Gerät: LaChrom Elite: DAD L-2455, Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Säulenofen L2350, EZChrom Elite; Fließmittelsystem A: Wasser mit *[Platzhalter für Zusätze]*, B: *[Platzhalter für die organische Phase mit Zusätzen]*; Gradient: *[Platzhalter für die Gradiententabelle]*; Flussrate: *[Platzhalter für da Volumen pro Minute]*; Detektion: *[Platzhalter für die Detektionswellenlänge]*; Säulenofen: *[Platzhalter für die Ofentemperatur]*

6.6.7.4.6 Dokumentation

Chromatogramme bei UV *[Platzhalter für die Wellenlänge]* nm

6.6.7.4.7 Bild des Chromatogramms

[Platzhalter für die Abbildung eines Beispielchromatogramms bei oben genannter Wellenlänge]

6.6.7.4.8 Auswertung des Ergebnisses

Beschreibung der auftretenden Peaks im Chromatogramm mit Angabe der Retentionszeit des zu quantifizierenden Peaks.

6.6.7.4.9 Methodeneignungstest

Festlegen des Methodeneignungstests. Üblicherweise wird die Auflösung des zu quantifizierenden Peaks mit einem benachbarten Peak verwendet.

6.6.7.5 Validierung

6.6.7.5.1 Materialien

6.6.7.5.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Angabe der Chemikalien und Lösungsmittel mit Hersteller

6.6.7.5.1.2 Pflanzenproben

Verwendete Referenzsubstanzen und Pflanzenproben mit botanischer Bezeichnung und evtl. lateinischer Drogenbezeichnung und Anbieter

6.6.7.5.1.3 Geräte

Verwendete Geräte

6.6.7.5.1.4 Software

Verwendete Software

6.6.7.5.2 Stabilität des Analyten in Lösung

Beschreibung des Experiments: Die Lösung einer authentischen Drogenprobe wird wie unter Punkt 6.6.7.4.1 beschrieben extrahiert. *[Platzhalter für das Volumen]* µL dieser Lösung wird wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben chromatographiert. Die Probe wird wiederholt in das System eingespritzt und die Chromatogramme der einzelnen Läufe ausgewertet, die relative Standardabweichung der Peakflächen des *[Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz]* darf nicht mehr als 6% betragen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Probe ist mindestens 3 Stunden in Lösung stabil, wenn sich die relative Standardabweichung der Peakfläche des *[Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz]* des Extraktes nicht mehr als 6% beträgt.

6.6.7.5.3 Spezifität

Beschreibung des Experiments: Die Testlösung wird wie unter Punkt 6.6.7.4.1 beschrieben hergestellt. Die Chromatographie erfolgt wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben, *[Platzhalter für die Beschreibung der Peaks die im erhaltenen Chromatogramm vorhanden]*

und/oder abwesend sein müssen]. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Methode ist spezifisch wenn *[Bedingungen für die Akzeptierung des Tests]*.

6.6.7.5.4 Kalibrierung

6.6.7.5.4.1 Messbereich (Range)

Für die Quantifizierung von *[Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz]* in den Proben von *[Platzhalter für die Pflanzenspezies]* unbekannten Gehalts muss der Messbereich festgelegt werden.

Vorversuch: Von den vorliegenden Pflanzenproben werden wie unter Punkt beschrieben 6.6.7.4.1 Extrakte hergestellt und wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben chromatographiert. Es werden Verdünnungen der Referenzsubstanz hergestellt und wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben chromatographiert. Es wird angenommen, dass sich das Detektorsignal und die aufgetragenen Proben-/ Referenzmengen proportional verhalten.

Festlegen des Messbereichs: Der Mittelwert der Detektorsignale des *[Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz]* in den unbekannten Proben wird als „Mitte“ des Messbereichs festgelegt. Der Messbereich wird als: $[„Mitte“ \pm 50 \text{ \%}]$ (ca. 50-150%) festgelegt. Es werden entsprechend 6 verschiedene (äquidistante) Konzentrationen der Kalibrierlösung hergestellt. Wenn sich die Probenlösungen nicht in diesem Bereich befinden, muss der Messbereich angepasst werden. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Messwerte der Proben müssen sich innerhalb des Messbereichs befinden.

6.6.7.5.4.2 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Gültigkeit des Kalibriersystems das unter Punkt 6.6.7.5.4.1 entwickelt wurde wird die Streuung der Analysenwerte bei der niedrigsten Konzentration und der höchsten Konzentration des Messbereichs überprüft. Hierfür werden jeweils 6 Lösungen mit niedrigster Konzentration und 6 Lösungen mit höchster Konzentration der Kalibrierlösungen wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben chromatographiert. Die Berechnung der Varianzen erfolgt mit Formel 1 (Seite 166).

Die Prüfgröße wird dann mit Formel 2 (Seite 167) berechnet.

Der Wert aus der F-Tabelle ist mit $F (P=99\%, f_1, f_2)$ zu entnehmen und mit der Prüfgröße PG zu vergleichen.

Ergibt sich für die Prüfgröße PG ein Wert größer als der F-Wert, ist der Varianzunterschied signifikant und die Varianzen inhomogen und der Arbeitsbereich muss angepasst werden. Die Konzentrationen werden angepasst und die Signale der neuen Lösungen gemessen. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Prüfgröße (PG) muss kleiner sein als der tabellierte F-Wert.

6.6.7.5.4.3 Kalibrierfunktion

Aus den Experimenten unter Punkt 6.6.7.5.4.1 (Vorversuch) werden die Konzentrationen für die 6 Konzentrationen der Kalibrierfunktion berechnet und aus einer Stammlösung die Verdünnungen für die Lösungen der Kalibriergeradeunktion hergestellt. Die einzelnen Konzentrationen werden jeweils dreimal wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 chromatographiert und ausgewertet.

6.6.7.5.4.4 Lineare Regression

Für die Berechnung der Kalibriergeraden werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration der Kalibrierlösung verwendet. Es wird eine Gerade berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt. Diese Gerade wird durch Formel 4 (Seite 168) beschrieben:

Für die Berechnung der Kalibriergerade werden die Parameter m und b mit den Formel 5 (Seite 166) bis Formel 12 (Seite 170) berechnet.

6.6.7.5.4.4.1 Reststandardabweichung

Die Präzision der Kalibriergeraden wird mit der Reststandardabweichung s_y ausgedrückt. Berechnet wird die Reststandardabweichung s_y mit der Formel 13 (Seite 170).

6.6.7.5.4.4.2 Verfahrensstandardabweichung

Aus der Reststandardabweichung s_y und der Steigung m der Kalibriergeraden (Empfindlichkeit E) errechnet sich die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} mit der Formel 14 (Seiten 170)

6.6.7.5.4.4.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Bei der rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} wird ausgehend von der Verfahrensstandardabweichung Bezug auf die Mitte des Konzentrationsbereichs \bar{x} genommen. Berechnet wird die rel. Verfahrensstandardabweichung mit Formel 15 (Seite 170).

6.6.7.5.4.5 Quadratische Regression

Für die Berechnung der Kalibrierkurve werden die gemessenen Werte in Abhängigkeit der Konzentration/Menge der Kalibrierlösung verwendet

Es wird eine polynomische Kurve berechnet, bei der die Summe aller Abweichungsquadrate der Messwerte in Y-Richtung von der Ausgleichsgerade den niedrigsten Wert einnimmt.

Diese Kurve wird durch folgende Gleichung beschrieben. Mit der allgemeinen Funktionsgleichung einer Parabel kann eine quadratische Regression erfolgen, Formel 16 (Seite 171). Mit den drei Parametern n , m und b kann eine quadratische Funktion zur Berechnung der Konzentrationen erstellt werden. Mit Formel 17 (Seite 171) bis Formel 24 (Seite 172) kann die Funktionsgleichung aufgestellt werden.

6.6.7.5.4.5.1 Reststandardabweichung

Die Reststandardabweichung s_y erfolgt nach Formel 25 (Seite 172).

6.6.7.5.4.5.2 Verfahrensstandardabweichung s_{x0}

Die Empfindlichkeit berechnet sich aus der ersten Ableitung der Regression, Formel 26 (Seite 172). Die Verfahrensstandardabweichung s_{x0} errechnet sich dann nach Formel 27 (Seite 172).

6.6.7.5.4.5.3 relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0}

Die relative Verfahrensstandardabweichung V_{x0} errechnet sich nach Formel 28 (Seite 172)

6.6.7.5.4.6 Anpassungstest nach Mandel

Ergibt sich aus den Berechnungen zur Verfahrensstandardabweichung für die quadratische Regression ein kleinerer Wert so ist ein Anpassungstest nach Mandel durchzuführen. Die berechneten Reststandardabweichungen für die quadratische und lineare Regression werden verwendet, um einen Anpassungstest nach Mandel vorzunehmen. Als Nullhypothese H_0 gilt: Eine Varianzinhomogenität bei vergleichen der Reststandardabweichungen von quadratischer und linearer Regression ist nicht vorhanden und die Unterschiede der Varianzen sind zufälliger Natur ($P=99\%$). Es liegt ein linearer Zusammenhang vor. Alternativhypothese H_1 : Es liegt ein quadratischer Zusammenhang vor. Die Restvarianzdifferenz Δs_y^2 für den Anpassungstest nach Mandel errechnet sich wie folgt:

$$\Delta s_y^2 = [(N_L - 2) * s_{yL}^2] - [(N_Q - 3) * s_{yQ}^2]$$

Formel 37

$N = 6$ (Anzahl der Punkte der Kalibrierung), L = Index für lineare Anpassung, Q = Index für quadratische Anpassung

Die berechnete Restvarianzdifferenz Δs_y^2 mit der quadratischen Restvarianz s_{yQ}^2 zu der Prüfgröße PG für einen F -Test zusammengefasst:

$$PG = \frac{\Delta s_y^2}{s_{yQ}^2}$$

Formel 38

Für die Berechnung der Freiheitsgrade (f_1/f_2 für die F -Tabelle) stehen folgende Gleichungen zur Verfügung:

$$\Delta f = (N_L - 2) - (N_Q - 3)$$

Formel 39

für Δf ergibt sich immer der Wert 1

$$f_1 = N_L - 2$$

Formel 40

$$f_2 = N_Q - 3$$

Formel 41

6.6.7.5.4.6.1 Auswertung des F-Test

Die Prüfgröße (PG) muss für die Annahme der Nullhypothese H_0 kleiner sein als der tabellierte Wert aus der F -Tabelle. Ist die Nullhypothese H_0 abzulehnen muss eine erneute Kalibrierung erfolgen! Die Konzentrationen (Levels) der Standards werden halbiert, eine entsprechende Anpassung der Probenkonzentrationen ist ebenfalls vorzunehmen. Die entsprechenden Prüfungen sind ab Punkt 6.6.7.5.4.1 Meßbereich (Range) mit verringerten Mengen/Konzentrationen durchzuführen.

Akzeptierung des Tests: Die Nullhypothese ist angenommen. Dann ist mit der Formel 5 (Seite 169) bis Formel 12 (Seite 170) eine Regressionsgerade aufzustellen mit der die Konzentrationen der [*Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz*] in den unbekannten Proben bestimmt werden kann.

6.6.7.5.4.7 Kalibrierfunktion

Erstellen der Kalibrierfunktion und den berechneten Parametern b und m

6.6.7.5.4.8 Korrelationskoeffizient r

Für die Gesamtstreuung der linearen Regression wird noch der Korrelationskoeffizient r berechnet. Die Berechnung wird mit Formel 30 (Seite 173) vorgenommen.

6.6.7.5.4.9 Probeauswertung und Prognoseintervall

Mit der Kalibrierfunktion kann die Konzentration/Menge der Substanz in den unbekannten Proben abgeschätzt werden. Die Kalibrierfunktion (Formel 4, Seite 168) wird nach x umgestellt und die Probenabschätzung kann mit Formel 31 (Seite 174) durchgeführt werden. Für die statistische Bewertung des Gesamtfehlers aus Kalibrierung und Messung der Proben wird eine Berechnung angestellt. Da sich die Fehler aufsummieren und fortpflanzen, liegt die

„wahre“ (jedoch unbekannte) Gerade zwischen zwei Hyperbeln. Die beiden Hyperbeln werden mit Formel 33 (Seite 175) berechnet.

Aus der Abb. 116: Graphen für die Bestimmung des Prognoseintervalls erschließt sich der Vertrauensbereich/Prognoseintervall (VB) einer Probe:

$$VB = x_o - \hat{x} = \hat{x} - x_u$$

Das Intervall in der sich der Analysenwert „wirklich“ befindet ist somit:

$$\hat{x} \pm VB$$

Die oberen und unteren Werte für die Prognoseintervalle berechnen sich mit Formel 33 (Seite 175)

6.6.7.5.5 Wiederholpräzision

Beschreibung des Experiments: Die Untersuchungslösungen werden wie unter Punkt 6.6.7.4.1 an einem Tag dreimal unabhängig von einander hergestellt und wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis 6.6.7.4.6 beschrieben chromatographiert. Die Auswertung erfolgt wie unter Punkt 6.6.7.4.8 beschrieben. Kriterium für die Akzeptierung des Tests:

Die Wiederholpräzision der Methode ist akzeptierbar, wenn der Variationskoeffizient (V_k) $\leq 5\%$ ist. Berechnung des V_k mit Formel 4 (Seite 168)

6.6.7.5.6 Laborpräzision

Beschreibung des Experiments: Das unter Punkt 6.6.7.5.5 beschriebene Experiment wird an 2 weiteren Tagen wiederholt. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Die Laborpräzision der Methode ist akzeptierbar, wenn der Variationskoeffizient (V_f) $\leq 5\%$ ist.

6.6.7.5.7 Robustheit

Beschreibung des Experiments: Die Methode wird wie unter Punkt 6.6.7.4 durchgeführt. Es wird ein Extrakt hergestellt, der mit Ausnahme der Säurekonzentration wie unter Punkt 6.6.7.4.5 chromatographiert wird. Die Konzentration der Säure wird auf [Platzhalter für die Angabe der Erhöhung] in beiden Eluenten erhöht. Kriterium für die Akzeptierung des Tests: Der gemittelte Gehalt der berechneten Probe aus diesem Versuch darf eine prozentuale Abweichung bezogen auf den berechneten Gehalt unter Punkt 6.6.7.5.4.9 Probenauswertung und Prognoseintervall von $\pm 5\%$ nicht übersteigen.

6.6.7.5.8 Wiederfindungsrate

Beschreibung des Experiments: Zu einem Pulver [*Platzhalter für die Masse*] von [*Platzhalter für die Pflanzenspezies*] wird eine definierte Menge von [*Platzhalter für die zu quantifizierende Substanz*] zugegeben (ca. 50% des Gehaltes, genaue Einwaage). Der Extrakt wird dann wie unter Punkt 6.6.7.4.1 hergestellt und wie unter Punkt 6.6.7.4.3 bis Punkt 6.6.7.4.6 dreimal chromatographiert. Die Wiederfindung berechnet sich aus den berechneten Gehalten (BG) und den gemessenen Gehalten (GG) nach Formel 34 (Seite 175)

6.6.7.5.9 Nachweisgrenze:

Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgt mit Formel 35 (Seite 175)

6.6.7.5.10 Quantifizierungsgrenze:

Die Berechnung der Quantifizierungsgrenze erfolgt mit Formel 36 (Seite 176)

6.6.8 HPLC-Methoden

6.6.8.1 Methode für die HPLC-Quantifizierung von Isochinolin-Alkaloiden

Säule: Purospher STAR RP-18e (5 µm), Hibar® RT 250-4, *Fa. VWR*, Darmstadt
Vorsäule: Purospher STAR RP-18e (5 µm), Hibar® RT 4-4, *Fa. VWR*, Darmstadt
Säulenofen: 25 °C
Fließmittel: A: Wasser mit 0,5% ortho-Phosphorsäure 85%
B: Acetonitril mit 0,5% ortho-Phosphorsäure 85%
Gradient: B: 0 - 10 Minuten: 20%
10 - 20 Minuten: 20% - 21%
20 - 35 Minuten: 21% - 35%
35 - 36 Minuten: 35%
36 - 37 Minuten: 35% - 20%
37 - 47 Minuten: 20%
Flussrate: 0,7 ml/Minute
Detektion: 344 nm

6.6.8.2 Methode für die HPLC-Quantifizierung von Forsythosid A

Herstellung der Testlösung: Rohdroge: 0,5 g gepulverte (355) Probe wurde mit 100 ml Methanol versetzt, im Wasserbad unter Rückfluss für 30 Minuten bei 65 °C extrahiert, und anschließend durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wird als Testlösung verwendet.

Kalibrierlösungen: Forsythosid A

Säule: Purospher STAR RP-18e (5 µm), Hibar® RT 250-4, *Fa. VWR*, Darmstadt
Vorsäule: Purospher STAR RP-18e (5 µm), Hibar® RT 4-4, *Fa. VWR*, Darmstadt
Säulenofen: 25 °C
Fließmittel: A: Wasser mit 0,1% Ameisensäure
B: Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure
Gradient B: 0 - 20 Minuten: 17,0% - 22,5%
20 - 25 Minuten: 22,5% - 90,0%
25 - 30 Minuten: 90,0% - 17,0%
30 - 35 Minuten: 17% linear
Flussrate: 0,6 ml/Minute
Detektion: 325 nm

6.6.9 HPTLC Methoden

6.6.9.1 Methode für die Identifizierung von *Astragali radix*

Herstellung der Testlösung von *Astragalus mongholicus* Proben: Rohdroge: 2 g gepulverte (355) Probe wurde mit 60 ml einer Mischung von Methanol/Ethylacetat (1:3) versetzt, unter Rückfluss 30 Minuten in einem Wasserbad extrahiert, anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde unter reduziertem Druck zur Trockenen eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 ml Ethylacetat aufgenommen, durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert und als Testlösung verwendet.

Herstellung der Referenzdrogenlösungen: Authentisches Drogenmaterial wie die Testlösungen

Referenzsubstanzen:

Astragalosid I

Astragalosid II

Astragalosid IV

Astragalosid VI

Astragalosid VII

Daizin

Herstellung der Derivatisierungsreagenzien:

Tauchlösung (200 ml): 160 mL Methanol und 40 ml 97-%ige Schwefelsäure mit Eis kühlen, unter rühren die Schwefelsäure vorsichtig zu dem Methanol geben, 1 Stunde warten bis die Lösung eiskalt ist.

Reagenzverwendung: Platte mit Tauchgerät (Eigenkonstruktion) für 2 Sekunden in die Derivatisierungslösung eintauchen, für 10 min bei 110 °C erhitzen.

Chromatographie:

Kammertyp: Doppeltröchkammer

Konfiguration: Gesättigt für 10 min

Fließmittel: Fließmittel: Ethylacetat/Methanol/Wasser (100:20:10)
10 ml Fließmittel je Trog

Trocknen: 5 min mit Kaltluft (Föhn)

Derivatisierung

Die Platte wird derivatisiert mit Schwefelsäurereagenz: 80 ml Methanol mit 20 ml Schwefelsäure 97% vorsichtig unter Eiskühlung mischen.

6.6.9.2 Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von *Coptidis rhizoma*

Herstellen der Testlösung: In einem 100 ml Rundkolben mit Schliff wurden 0,100 g pulverisierte Droge (355) mit 95 ml einer Mischung von Methanol R und Salzsäure R (100:1) versetzt und in einem Ultraschallbad 15 Minuten extrahiert, anschließend auf 100,0 ml aufgefüllt und durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert (0,45 µm).

Stationäre Phase: 200x100 mm HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄

Chromatographie:

Kammertyp: 200x100 mm Doppeltrogkammer in Automatischer Entwicklungskammer 2 (ADC 2)

Konfiguration: Gesättigt für 10 min

Fließmittel: Toluol/Ethylacetat/Isopropanol/Methanol/Wasser
(60/30/15/15/3) 10 ml in der Entwicklungskammer

Konditionierungsmittel 25 ml 32%-ige Ammoniaklösung in der Sättigungskammer

Trocknen: 10 min mit Kaltluft (Fön)

Dokumentation: ohne Derivatisierung bei UV 366 nm

Referenzsubstanzen:

Jatrorrhizin

Palmatin

Berberin

Epiberberin

Coptisin

6.6.9.3 Methode für die Identifizierung von *Forsythiae fructus*

Herstellen der Testlösung:

Rohdroge: 1 g gepulverte (355) Probe wurde mit 10 ml Methanol versetzt, im Ultraschallbad für 10 min extrahiert, und anschließend durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter gefiltert. Das Filtrat wurde als Testlösung verwendet.

Referenzsubstanzen: Arctiin, Phillyrin, Pinoresinol, Salidroside

Herstellen der Derivatisierungsreagenzien

200 ml Methanol wurden mit Eis gekühlt und zu 100 ml eisgekühlten Methanol 2 ml 97% Schwefelsäure gegeben. Nach 1 Stunde warten wurden zur eiskalten Lösung 1 g Vanillin zugeben und das Becherglas 3-mal mit 33 ml eisgekühlten Methanol ausgewaschen. Platte mit Tauchgerät (Eigenkonstruktion) wurde für 2 Sekunden in die Derivatisierungslösung eingetaucht und für 10 min bei 110 °C erhitzt.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Chromatographie:

Kammertyp:	Doppeltrogkammer
Konfiguration:	Gesättigt für 10 min
Fließmittel:	Fließmittel: Toluol/Aceton/Ethylacetat/Ameisensäure/Wasser (40:50:60:6:6) 10 ml Fließmittel je Trog
Trocknen:	5 min mit Kaltluft (Fön)

Derivatisierung

Die Platte wurde derivatisiert mit Vanillin/Schwefelsäurereagenz.

Dokumentation

Nach der Derivatisierung bei Tageslicht

Nach der Derivatisierung bei UV 366 nm

6.6.9.4 Methode für die Quantifizierung von Forsythsid A in Forsythiae fructus

Herstellen der Testlösung: Rohdroge: 2,0 g gepulverte (355) Probe wurde mit 100 ml Methanol versetzt, im Wasserbad unter Rückfluss für 30 Minuten bei 65°C extrahiert, und anschließend durch einen 0,45 µm HPLC Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wurde als Testlösung verwendet.

Stationäre Phase: HPTLC- RP- 18 W F₂₅₄S

Chromatographie

Kammertyp:	200x100 mm Doppeltrogkammer
Konfiguration:	Gesättigt für 10 min

Fließmittel: Acetonitril/Wasser 20:80 (+1% Ameisensäure) 10 ml
Trocknen: 15 min mit Kaltluft (Fön)

Dokumentation: Ohne Derivatisierung bei UV 366 nm

6.6.9.5 Methode für die Identifizierung von Leonuri herba

Rohdroge: 1 g gepulverte (200) Probe wurde mit 100 ml Methanol versetzt, unter Rückfluss 10 Minuten bei 65 °C in einem Wasserbad extrahiert und anschließend durch einen Faltenfilter filtert. Das Filtrat wurde als Testlösung verwendet.

Referenzsubstanzlösungen:

2,5 mg	Rutin	in 10,0 ml Methanol lösen
2,5 mg	Hyperosid	in 10,0 ml Methanol lösen
1,0 mg	Kaffeesäure	in 10,0 ml Methanol lösen

Tauchlösung 1 (200 ml):

1 g Diphenylborylethylamin in 200 ml Methanol lösen.

Tauchlösung 2 (200 ml):

5 g Macrogol 400 in 200 ml Methanol lösen.

Reagenzverwendung: Vor dem Tauchen wurde die Platte für 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Die Platte wurde mit Tauchgerät (Eigenkonstruktion) für 2 Sekunden in die Derivatisierungslösung 1 eingetaucht und für 1 Minute bei 110 °C trocknen gelassen. Danach wurde die Platte für 2 Sekunden in Derivatisierungslösung 2 eingetaucht und für 5 Minuten bei 110 °C getrocknet.

200x100 mm HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

100x100 mm HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

200x200 mm TLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

10,0 µl der Testlösungen und 2,0 bzw. 3,0 µl der Referenzsubstanzlösungen wurden als 10 mm lange Banden, mindestens 16 mm voneinander getrennt, 10 mm vom unteren Ende und mindestens 20 mm vom linken und rechten Rand der Platte entfernt, aufgetragen.

7 Literaturverzeichnis

Akira I, Hideji I. Estimation of coptis rhizomes on TLC. Shoyakugaku Zasshi 37, 195-197 (1983)

AMG (Gesetz über den Verkehr von Arzneimitteln) Fassung vom 11. Dez. 1998, zuletzt geändert durch Gesetz vom 17. Juli 2009; § 5 (1)-(2) (2009a)

AMG (Gesetz über den Verkehr von Arzneimitteln) Fassung vom 11. Dez. 1998, zuletzt geändert durch Gesetz vom 17. Juli 2009; § 55 (1)-(8), (2009b)

AMG (Gesetz über den Verkehr von Arzneimitteln): Fassung vom 11. Dez. 1998, zuletzt geändert durch Gesetz vom 17. Juli 2009; §4 (15), (2009c)

Bensky D, Clavey S, Stöger E. Materia Medica: Chinese Herbal Medicine, Eastland Press; Auflage 3 (2004)

Bensky D, Calvey S, Stöger, E. Materia Medica: Chinese Herbal Medicine, 3 edition, Eastland Press, Astragali Radix, 722 (2004b)

BfArM: http://www.bfarm.de/cIn_012/nn_1199256/DE/Arzneimittel/2__zulassung/zulVerfahren/azBuch/10azBuecher/10-30verbindlichkeitAzBuch/verbindlichkeit-inhalt.html (2005a)

BMG (Bundesministerium für Gesundheit) Bekanntmachung von Empfehlungen für Höchstmengen an Schwermetallen bei Arzneimitteln pflanzlicher und tierischer Herkunft. Arzneimittel Kontaminantenempfehlungen-Schwermetalle. Entwurf vom 17.10.1991

Chuang W, Young D, Liu L, S. Shuenn-Jyi. Liquide chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of Coptidis Rhizoma, Journal of Chromatography A, 755, 18-26 (1996)

Dostál J, Man S, Sekáková P, Hulová D, Neas M, Potáček M, Touek J, Dommissie R, Van Dongen W, Marek R. Berberine and coptisine free bases. Journal of Molecular Structure, 687, 135-142 (2004)

EDCM: http://www.edqm.eu/medias/fichiers/NEW_European_Pharmacopoeia_Style_Guide_July_2008.pdf, (2005a)

EDQM: http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Technical_Guide_for_the_Elaboration_of_Monographs_on_herbal_drugs_and_herbal_drug_preparations_2007.pdf, (2007a)

ESCOP: ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, Thieme, Stuttgart; Auflage: 2nd Revised edition (2003)

Funk W, Dammann V, Vonderheid C, Oehlmann G. Statistische Methoden in der Wasseranalytik. VCH, Weinheim (1987)

Gabreils M, Plaizier-Vercammen J. Development of a reversed-phase thin-layer chromatographic method for artemisinin and its derivatives, Journal of Chromatographic Science, 42, 341-347 (2004)

- Hänsel R, Sticher O.** Pharmakognosie Phytopharmazie, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Hänsel, R: 204 (2007)
- Heuberger H, Bomme U, Groß J, Kabelitz L, Reif K, Schmücker R.** Inhaltsstoffgehalte ausgewählter Heilpflanzen für die traditionelle chinesische Medizin aus deutschem Versuchsanbau im Vergleich zu Importware aus Asien; Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen 13, 173-181 (2008)
- Hong Kong Materia Medica Standards Volume 2:** Monographie: Radix Astragali (2008a)
- Ihrig M, Kaunzinger A, Baumann J, Orbig H, Reising K, Schäfer R, Scholl C.** Qualitätsmängel bei TCM-Drogen. Pharmazeutische Zeitung 149, 3776-3783 (2004)
- Janicsak G, Toth E, Mathe I.** TLC-Densitometric investigation of phenylpropanoid glycosides in Black Horehound (*Ballota nigra* L.), Journal of Planar Chromatography 20, 443-446 (2007)
- Kabelitz L.** Zur Schwermetallbelastung von Arznei- und Kräuterdrogen. Pharmind 60, 444-451 (1998)
- Kato A, Moriyasu M, Ichimaru M, Nishiyama Y.** Isolation of alkaloidal constituents of *Zanthoxylum usambarense* and *Zanthoxylum chalybeum* using Ion-Pair HPLC Journal of Natural Products 59, 316–318 (1996)
- Körfers A, Sun Y.** Traditionelle Chinesische Medizin: Arzneidrogen und Therapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, S. XII, (2009a)
- Körfers A, Sun Y.** Traditionelle Chinesische Medizin: Arzneidrogen und Therapie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, S. XXVI-XXXI, (2009b)
- Lee HS, Eom YE, Eom DO.** Narrowbore high performance liquid chromatography of berberine and palmatine in crude drugs and pharmaceuticals with ion-pair extraction using cobalt thiocyanate reagent. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 59-63 (1999)
- Lingling R, Xingya X, Feifang Z, Xinmiao L.** High performance liquide chromatography-mass spectrometry analysis of protoberberine alkaloids in medicine herbs, Journal of Separation Science 20, 833-843 (2007)
- Lu Y., Xu Q, Shao A.:** Determination of alkaloids in Coptis by thin-layer chromatography, Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis 5, 290-292 (1985)
- Marek R, Seckárová P, Hulová D, Marek J, Dostál J, Sklenár V.** Palmatine and berberine isolation artifacts. Journal of Natural Products 66, 481-486 (2003)
- Min YD, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR.** Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino. Archives of Pharmaceutical Research 29, 757-761 (2006)
- Miszczyk M, Pyka A.** Comparisation of normal and reversed-phase TLC for separatin of selected pesticides Journal of Planar Chromatography 19, 15-20 (2006)

- Ph. Eur.** (Pharmacopoea Europaea): Allgemeine Monographien: Pflanzliche Drogen. 6. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/Govi Verlag Eschborn, Band 1, S. 991 (2008a)
- Ph. Eur.** (Pharmacopoea Europaea): Allgemeine Monographien: Pflanzliche Drogen. 6. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/Govi Verlag Eschborn, Band 1, S. 990 (2008b)
- Ph. Eur.** (Pharmacopoea Europaea): Allgemeine Methoden: Trocknungsverlust (6.0/2.02.32.00) Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/Govi Verlag Eschborn (2008c)
- Ph. Eur.** (Pharmacopoea Europaea): Allgemeine Methoden: Asche (6.0/2.04.16.00) Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/Govi Verlag Eschborn (2008d)
- Ph. Eur.** (Pharmacopoea Europaea): Monographie: Herzgespannkrut. 6. Ausgabe, Dtsch. Apoth. Verlag Stuttgart/Govi Verlag Eschborn, Band 2 (2008e)
- Ph. J.** (THE JAPANESE PHARMACOPOEIA FIFTEENTH EDITON): Astragalus Root (2006)
- Ph. VR China:** Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005 (english edit) (2005a)
- Ph. VR China:** Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume I: Radix Astragali (2005b)
- Ph. VR China:** Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume I: Rhizoma Coptidis (2005c)
- Ph. VR China:** Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume I: Fructus Forsythiae (2005d)
- Ph. VR China:** Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume I: Herba Leonuri japonici (2005e)
- Stefaniak M.** Effect of temperature on the RF of porphine and its metal complexes in normal and reversed-phases TLC, Journal of Planar Chromatography 21, 201-204 (2008)
- Stiborová M, Frei E, Arlt VM, Schmeiser HH.** Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. Mutation Research 658, 55-67 (2008)
- Stöger EA.** Arzneibuch der Chinesischen Medizin, Monographie: Astragali Radix, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag (2009)
- Suau R, Rico R, López-Romero JM, Nájera F, Cuevas A.** Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* subsp. *australis*. Phytochemistry 49, 2545-2549 (1998)
- Tripathi AN, Chauhan L, Thankachan PP, Barthwal R.** Quantum chemical and nuclear magnetic resonance spectral studies on molecular properties and electronic structure of berberine and berberrubine. Magnetic Resonance in Chemistry 45, 647-655 (2007)
- Upton R.:** Astragalus Root, American herbal Pharmacopoeia (1999)
- Vanherweghem J, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M,**

Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 341, 387-391 (1993)

Vlietinck A. Astragalus root, Astragali radix, Monograph N°:2435, updated draft (2007)

Wagner H. Chinese Drug Monographs and Analysis: Fructus Forsythiae Lianqiao, Vol. 6, No. 35 (2005)

Wagner H. Chinese Drug Monographs and Analysis: Rhizoma Coptidis Huanglian, Vol. 5, No. 28 (2004)

Wagner H. Chinese Drug Monographs and Analysis: Radix Astragali (Huang Qi), Vol. 1, No. 8 (1997)

Wagner H, Bladt Drug Plant Analysis, 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin (1996)

Zhu M. Quantitative analysis of alkaloids in corydalis by High-performance thin-layer chromatography. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* 5, 139-142 (1985)

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: ArP 1	12
Abb. 2: ArP 2	12
Abb. 3: ArP 3	12
Abb. 4: ArP 4	12
Abb. 5: ArP 5	12
Abb. 6: ArP 6	12
Abb. 7: Faserbündel	13
Abb. 8: Gefäße im Parenchym	13
Abb. 9: Faserbündel mit Stärke	13
Abb. 10:	14
Abb. 11: Daidzin	15
Abb. 12: 2-D Entwicklung	15
Abb. 13: Stabilität Platte/Lösung	16
Abb. 14: Stabilität T_5	17
Abb. 15: Stabilität T_{30}	17
Abb. 16: Spezifität	18
Abb. 17: HPTLC Wiederholpräzision	19
Abb. 18: HPTLC Entwicklungsstrecke 65 mm	21
Abb. 19: HPTLC Entwicklungsstrecke 50 mm	21
Abb. 20: DC Entwicklungsstrecke 100 mm	22
Abb. 21: CrP 1	25
Abb. 22: CrP 2	25
Abb. 23: CrP 3	25
Abb. 24: CrP 4	25
Abb. 25: Steinzelle <i>C. deltoidea</i>	26
Abb. 26: Steinzelle <i>C. chinensis</i>	26
Abb. 27: Stärkeparenchym, <i>C. chinensis</i>	26
Abb. 28: Korkfragment, <i>C. chinensis</i>	26
Abb.: 29	27
Abb. 30: 2-D Entwicklung Berberin	28
Abb. 31: 2-D Entwicklung Coptisin	28
Abb. 32: 2-D Entwicklung Jatrorrhizin	28
Abb. 33: 2-D Entwicklung Palmatin	28
Abb. 34: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung	29

Abb. 35: Stabilität	29
Abb. 36: Spezifität der Methode	30
Abb. 37: HPTLC Prüfung auf Verunreinigungen	31
Abb. 38: Wiederholpräzision.....	32
Abb. 39: Robustheit 70 mm	34
Abb. 40: HPTLC Robustheit (25% NH ₃ -Lösung).....	35
Abb. 41: HPTLC Robustheit (32% NH ₃ -Lösung).....	35
Abb. 42: Spezifität	36
Abb. 43: 2D-Entwicklung	38
Abb 44: Stabilität der Extraktionlösung	39
Abb. 45: Coptidis rhizoma, Stabilität des Ergebnis, T ₀	41
Abb. 46: Coptidis rhizoma, Stabilität des Ergebnis, T ₆₀	41
Abb. 47: Vergleich Extrakte mit Referenzsubstanzen	42
Abb. 48: Detektion von Verfälschungen.....	43
Abb. 49: Vorversuch Messbereich Coptidis rhizoma.....	44
Abb. 50: Messbereich Platte Coptidis rhizoma	45
Abb. 51: Spezifität der Methode	60
Abb. 52: Vorversuch der Kalibrierung für die HPLC von Coptis	61
Abb. 53: Kalibriergeraden von Berberin, Coptisin, Epiberberin und Palmatin.....	65
Abb 54: Kalibrierfunktionen nach quadratischer Regression (Coptis Alkaloide, HPLC).....	67
Abb. 55: Chromatogramm/ Rohextrakt	75
Abb. 56: Chromatogramm jatrorrhizinarne Phase.....	75
Abb 57: Extraktionsschema.....	76
Abb. 58: Forsythosid A	78
Abb. 59: Forsythiae fructus Übersicht.....	79
Abb. 60: Forsythiae fructus Detail.....	79
Abb. 61: Cuticulafragment	79
Abb. 62: Cuticulaquerschnitt.....	79
Abb. 63: Steinzellenverband.....	80
Abb. 64: Parenchymatische Zellen	80
Abb. 65: Fruchtquerschnitt	80
Abb. 66: Arctiin	81
Abb. 67: Salidrosid	81
Abb. 68: Phillyrin	81
Abb. 69: Pinosrsinol	81
Abb. 70: 2-D Entwicklung, Tageslicht	82

Abb. 71: 2-D Entwicklung 366 nm	82
Abb. 72: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung, Tageslicht	83
Abb. 73: Stabilität der Analyten auf der Platte und in Lösung	83
Abb. 74: Stabilität der Derivatisierung, 5 min	84
Abb. 75: Stabilität der Derivatisierung, 30 min	84
Abb. 76: Stabilität der Derivatisierung, 5 min	85
Abb. 77: Stabilität der Derivatisierung, 30 min	85
Abb. 78: Spezifität (<i>Forsythiae fructus</i>), 366 nm	86
Abb. 79: Spezifität (<i>Forsythiae fructus</i>), Tageslicht	86
Abb. 80: Chromatogrammausschnitt (Fingerprint <i>Forsythiae fructus</i>)	87
Abb. 81: Spezifität <i>Forsythiae fructus</i> (Tageslicht)	87
Abb. 82: Spezifität <i>Forsythiae fructus</i> (UV 366 nm)	88
Abb. 83: HPTLC-Wiederholpräzision (<i>Forsythiae fructus</i>), Tageslicht	89
Abb. 84: HPTLC-Wiederholpräzision (<i>Forsythiae fructus</i>), 366 nm	89
Abb. 85: DC Robustheit (<i>Forsythiae fructus</i>), DC-Aluminiumfolie mit Kieselgel	91
Abb. 86: DC-Robustheit (<i>Forsythiae fructus</i>), DC-Aluminiumfolie mit Kieselgel	92
Abb. 87: HPTLC-Robustheit (<i>Forsythiae fructus</i>), 70 mm, Tageslicht	94
Abb. 88: HPTLC-Robustheit (<i>Forsythiae fructus</i>), 50 mm, Tageslicht	94
Abb. 89: HPTLC-Robustheit <i>Forsythiae fructus</i>), 70 mm, 366 nm	95
Abb. 90: HPTLC-Robustheit (<i>Forsythiae fructus</i>), 50 mm, 366 nm	95
Abb. 91: 2-D Entwicklung (<i>Forsythiae fructus</i>)	98
Abb. 92: Stabilität der Analyten (<i>Forsythiae fructus</i> , Platte/Lösung)	98
Abb. 93: Stabilität des Ergebnis T_0 (<i>Forsythiae fructus</i>)	99
Abb. 94: Stabilität des Ergebnis T_{30} (<i>Forsythiae fructus</i>)	99
Abb. 95: <i>Forsythiae fructus</i> : Vergleich der Extrakte mit Forsythosid A	100
Abb. 96: Vorversuch Messbereich	101
Abb. 97: Spezifität der Methode	111
Abb. 98: Kalibriergerade Vorversuch	112
Abb. 99: Kalibriergerade Forsythosid A (HPLC)	114
Abb. 100: Quadratische Regression Forsythosid A (HPLC)	115
Abb.: 101: Hyperosid und Rutin	120
Abb.: 102: Kaffeesäure	120
Abb. 103: Leonuri herba Übersicht	121
Abb. 104: Cuticulafragment	121
Abb. 105: Drüsenschuppe	121
Abb. 106: Einzelliges Haar	121

Abb. 107: Flavonoidmuster <i>Leonurus japonicus</i> (Herba)	122
Abb. 108: 2-D Entwicklung	123
Abb. 109: Stabilität Platte/Lösung.....	124
Abb. 110: Stabilität der Derivatisierung von Leonuri herba Extrakt nach 5 min	124
Abb. 111: Stabilität der Derivatisierung von Leonuri herba Extrakt nach 60 min	125
Abb. 112: Spezifitätsuntersuchung (UV 366 nm), Leonuri herba	125
Abb. 113: DC-Robustheit (Leonuri herba).....	128
Abb. 114: HPTLC-Robustheit (40 mm, Leonuri herba)	129
Abb. 115: HPTLC-Robustheit (60 mm), Leonuri herba)	129
Abb. 116: Graphen für die Bestimmung des Prognoseintervalls	174

9 Abkürzungsverzeichnis

%B	Anteil an Fließmittel B bei Gradientensystemen
µl	Mikroliter
ADC2	Automatische Entwicklungskammer 2
AMG	Arzneimittelgesetz
ArP 1	Astragali radix Probe 1, Anbieter CaeLo
ArP 2	Astragali radix, Anbieter PharmaChin
ArP 3	Astragali radix, Anbieter LfL
ArP 4	Astragali radix, Anbieter Complemdis
ArP 5	Astragali radix, Anbieter Herbasin
ArP 6	Astragali radix, Anbieter lokaler Markt in Hongkong
CrP 1	Coptis chinensis Probe (Rhizom) , Anbieter CaeLo
CrP 2	Coptis chinensisProbe (Rhizom), Anbieter Complemedis
CrP 3	Coptis chinensis Probe (Rhizom), Anbieter Herbasin
CrP 4	Coptis chinensis Probe (Rhizom), Anbieter PharmaChin
CrP 6	Coptis deltoidea Probe (Rhizom)
CrP 7	Coptis teeta Probe (Rhizom)
CrP5	Coptis chinensis Probe (Rhizom)
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatogramm
ESCoP	EuropeanScientific Coooperative on Phytotherapie
FBC	Flachbodenkammer
FDA	Food and Drug Administration
FfP 2	Forsythiae fructus, Anbieter Complemedis
FfP 3	Forsythiae fructus, Anbieter Herbasin
FfP 4	Forsythiae fructus, Anbieter PharmaChin
FfP1	Forsythiae fructus, Anbieter CaeLo
h	Stunde
HPLC	Hochauflösendes Flüssigchromatographie
HPTLC	Hochauflösendes Dünnschichtchromatogramm
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie
ICH	International conference on harmonisation fo technical requirements for regestration of pharmaceuticals for human use
ID	Innendurchmesser

I	Länge
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
LhP 2	Leonuri herba, Anbierter Herbasin
LhP 3	Leonuri herba, Anbierter LfL
LhP 4	Leonuri herba, Anbierter Sinoherb
LhP1	Leonuri herba, Anbierter Complemedis
MG	Macrogol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
n.V.	nicht vorhanden
nm	Nanometer
NR	Naturstoffreagenz
OTC	over the counter, Sichtwahl in der Apotheke
p.A.	pro Analysis
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
Ph. VR China	Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2005, engl. Edit.
R _F	Retardationsfaktor
rH	relative Luftfeuchte
RP	Reversed Phase
Tab.	Tabelle
TTC	Doppeltrogkammer
UV	Ultravioletes Licht
VK	Variationskoeffizient

10 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen ganz herzlich, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann und Herrn Prof. Dr. Gerhard Franz für die Überlassung des Themas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung, sowie die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit, dem großzügigem Entgegenkommen, die Promotion außerhalb der Universität beenden zu können und dass Sie mir während dieser Zeit wohlwollend zur Seite gestanden haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Guido Jürgenliemk herzlich bedanken. Zum einen für seine offene, stete Art als Vorgesetzter und Kollege, zum anderen für die angeregten persönlichen Gespräche die sich nicht ausschließlich um die Naturwissenschaft drehten.

Ein besonderes Dankeschön auch an meine LaborkollegInnen Susann, Regina, Cornelia, Anne, Rosi und Matěj welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Herzlichen Dank auch für die harmonische und unkomplizierte Laboratmosphäre, zu der jeder seinen Beitrag geleistet hat.

Danke an die guten Seelen des Lehrstuhls Anne und Gabi. Ohne Eure Unterstützung wäre vieles nicht realisierbar gewesen.

Herzliches vergelt's Gott an Frau Ohli und Frau Wolf für die Begleitung durch den bürokratischen Alltag an der Universität.

Danke auch an Dr. Kraus, Dr. Vogel, Dr. Bradac, Dr. Nickel, für die Zusammenarbeit am Lehrstuhl, speziell auch Fr. Apothekerin Geiger für die Unterstützung meiner Arbeit während Ihres Pharmaziepraktikums.

Weiterhin bedanke ich mich bei:

der BfArM, Bonn insbesondere Herrn Prof. Dr. Schnädelbach für die großzügige finanzielle Unterstützung der Arbeit.

der Firma Sarstedt, Nümbrecht insbesondere Herrn A. Russer für die zur Verfügungstellung der Geräte, sowie die wertvollen technischen Hinweise auch Abseitz der eigenen Produkte und die unerwarteten Gespräche.

der Firma Camag, Muttenz/CH insbesondere Frau Dr. A. Anklie und Herrn Dr. E. Reich für die Zurverfügungstellung der Geräte sowie die wertvollen wissenschaftlichen Hinweise und die von ihr investierte Zeit und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Der Firma Phytolab, Vestenbergkreuth insbesondere Herrn Dr. B. Klier und Herrn Dr. M. Schwarz für die generöse Zurverfügungstellung der Referenzsubstanzen.

Herrn Prof. Dr. Ihsan Calis (Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Türkei) für die sehr hilfreiche und generöse Überlassung der Astragaloside, die fruchtbaren Diskussionen während seines Forschungsaufenthalts am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie in Regensburg und die sehr menschlichen Gespräche zu Beginn meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Bomme (Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Arbeitsgruppe IPZ 3 d: Pflanzenbausysteme bei Heil- und Gewürzpflanzen, Freising, Bayern) für die sehr hilfreiche und grosszügigie Überlassung von authentischen Drogenproben von *Astragalus membranaceus*, *Leonurus japonicus*.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.